الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
جامعة منتوري قسنطينة

كلية : العلوم الدقيقة **قسم: الكيمياء**

رقم الترتيب ....

رقم التسلسل ....

مذكرة
مقدمة لنيل شهادة الماجستير في العلوم
تخصص كيمياء عضوية
شعبة كيمياء النبات

تحت عنوان

استخلاص ، فصل وتحديد بنيات منتوج الأيض الثانوي عند

نبات جنس *Centaurea*

C. Involucrata

تقديم :كنوش سميرة

لجنة المناقشة:

الدكتورة فضيلة بن عياش	**أستاذة بجامعة منتوري قسنطينة**	**رئيسة**
الدكتورعلي بن تامن	**أستاذ محاضر بجامعة منتوري قسنطينة**	**مشرف ومقرر**
الدكتور سمير بن عياش	**أستاذ بجامعة منتوري قسنطينة**	**ممتحنا**
الدكتور لحسن زعيتر	**أستاذ محاضر بجامعة منتوري قسنطينة**	**ممتحنا**
الدكتور الشريف بهلول	**أستاذ محاضر بجامعة منتوري قسنطينة**	**ممتحنا**

الإهداء

إلى والديّ الكريمين اللذين كانا سبب وجودي وتعليمي.

إلى إخوتي و أخواتي.

إلى الساهرين على حمل مشعل النور ليضيئوا للأجيال طريق الهدى والتقدم.

إلى كل الأهل و الأحباب.

التشكرات

الحمد لله ولي التوفيق ...

أتقدم بالشكر الجزيل للأستاذ المشرف علي بن تامن على توجيهاته ونصائحه و مساهمته القيمة من أجل تقديم هذا العمل على أحسن وجه .

كما أتقدم بالشكر الخالص للأستاذة فضيلة بن عياش لقبولها رئاسة اللجنة و على المجهود و المساعدة التي قدمتها لي خلال إنجازي هذا البحث.

أتقدم بالشكر الخالص إلى الأساتذة الكرام سمير بن عياش ،الشريف بهلول و لحسن زعيتر لقبولهم عضوية اللجنة .

إلى كل أعضاء مخبر التحليل الفيزيوكيميائي والبيولوجي قسم الكيمياء جامعة منتوري قسنطينة .

إلى كل زملائي وزميلاتي في المخبر إلى كل من ساعدني من قريب أو من بعيد.

الفهرس

الفصل الثاني الدراسة البنيوية للفلافونيدات

الفصل الثالث الدراسة الفيتوكيميائية للنبتة

مقـدمة

منذ القِدم والإنسان مهتم بصحته وهاجس الحياة والبقاء هوالذي يشغل تفكيره، لذا تراه يبحث ويستكشف كل ما هو جديد لأجل الحفاظ على جنسه البشري وقد اهتم هذا المخلوق بأمور الطب والتداوي ولجأ في ذلك إلى الأعشاب والنباتات التي وجد فيها مبتغاه في تخفيف ألامه وتسكين أوجاعه وعلاج أمراضه في العهد القديم الذي لم تتوفر فيه علاجات كيمياوية مصنّعة.

المصادر التاريخية اختلفت في رصد ومعرفة أوائل المستخدِمين لهذه العلاجات فبعضها ذكر أن حكماء الصين أقدم من استخدم طب الأعشاب وبدأ به. وهم من ألّفوا أول كتاب عن التداوي بالأعشاب، والذي أصبح فيما يعد أساساً لجميع المعلومات الطبية. في بابل كان القدماء يدونون فوائد الأعشاب على ألواح من الطين بعد التأكد من نجاحها في العلاج وكذا الحال في مصر القديمة وفراعنتها وما وجد من مدونات ورسوم تشير لاهتمامهم بهذا الطب.

أما العرب والمسلمين فقد أبدعوا في هذا المجال وطوروه وتوسعوا في تجاربهم في مجال التداوي بالأعشاب واكتشفوا العلاجات والمراهم الطبية الخاصة، فكان منهم أساتذة الطب وعلماء النفس المتخصصين دوّنوا تجاربهم وملاحظاتهم في مخطوطات وكتب مهمة مازالت تستخدم كمصادر ومراجع في الدراسة الجامعية لكثير من البلدان.

في بغداد أسست أول صيدلية ومذخر طبي أختص بتجميع الأدوية والمستحضرات العلاجية المنتجة من الأعشاب والنباتات و هم أول من استخدم الكحول لإذابة المواد التي لاتذوب في الماءوقد وردت الكثير من الاحاديث الشريفة عن الأعشاب ومثال على ذالك **قول النبي صلى الله عليه وسلم**

(عليكم بأربع، فإن فيهن شفاء من كل داء إلا السام(الموت) ، السنا والسنوت والثفاء والحبة السوداء)..لكن مع تقدم الطب تراجع استعمال الأعشابوأصبح استخدامها محدودا فيصورة عادات وتقاليد يمارسها العجائز الذين توارثوها جيلابعد جيل أو في المناطق الجبلية وقبائل البدو الذين يعيشون في

الصحراء،بعيدا عنالمدن التي انتشرت فيها المستشفيات الحديثة وكانت لديهم دراية بقيمة تلك الأعشابالأمر الذي جعلهم مقصدا للمرضى، الذين يعرفون قدرة تلك القبائل البدوية على معرفة أسرار العلاج بالأعشاب، لكن مع تقدم الطب وظهور عدد من الآثار الجانبية للكثير منالأدوية المخلقة في المعامل، عادت البشرية إلى الأعشاب لكن بطرق أخرى أكثر تقنيةبحيث تم استخلاص أدوية كثيرة لعلاج العديد من الأمراض وقامت شركات الأدوية الكبربالاعتماد على الأعشاب في استخلاص المواد الحيوية التي تستخدمها في صناعة بعضالأدوية، بطرق تكاد تختلف عن طرق استخدام الطب التقليدي البديل لها .

تزدحم قائمة النباتاتالطبية والأعشاب والحشائش الدوائية بعشرات الألوف من أصنافها، بل وتتزايد دائماتباعا بما يكتشفه العلماء في الحقول بين النباتات المعروفة أو في الصحارى أوفي كهوف الجبال أو غيرها من الأماكن غيرالمألوفة.

تتربع الجزائر على مساحة شاسعة ذات مناخ معتدل سمح بنمو غطاء نباتي متنوع ، مما دفع الباحثين الجزائريين إلى دراسة و إستثمار هذه الثروة النباتية، خاصة النباتات الطبية لما تحتويه على مواد كيميائية ناتجة عن عمليات الأيض الثانوي ذات الفعالية البيولوجية والفيزيولوجية الهامة، لهذاأجريت في مختبرنا دراسات عديدة لمجموعات مهمة من نباتات جزائرية، من بينها نبات جنس *Centaurea* الذي ينتمي إلى العائلة المركبة *Compositae* فهي من أرقى العائلات النباتية تضم حوالي 1000جنس وأكثر من 25000نوع [1]، تحتوي الجزائر على حوالي 109جنس و أكثر من 408 نوع [2] من هذه العائلة.

غنى هذه النباتات بنواتج الأيض الثانوي مثل الفلافونيدات واللاكتونات السيسكويتربينية[3] والسترويدات [4] جعلها هدفا للعديد من الدراسات.

وهذه بعض الأنواع التي درست في مخبرنا حيث تم فصل العديد من المركبات المبينة فيالجدول(1).

النبتـة	نوع وعدد المركبات المفصولة
Centaurea lippii	ثلاث فلافونيدات [5] لاكتون سيسكوي تربيني [5]
Centaurea musimomum	أربعة عشرة لاكتون سيسكوي تربيني [6، 7]
Centaurea napifolia	خمس فلافونيدات [8] لاكتون سيسكوي تربيني[8]
Centaurea incana	أربعة عشرة فلافونيد[9]
Centaurea calcitrapa	إثناعشرة فلافونيد[10] إثنين لاكتون سيسكوي تربينين[11]
Centaurea pullata	إثنين لاكتون سيسكوي تربينين [12]
Centaurea nicaensis	إثنا عشرة فلافونيد[13] أربع لاكتون سيسكوي تربيني[14]
Centaurea furfuracea	إثنا عشرة فلافونيد [15،16]
Centaurea parviflora	أربع فلافونيد[17]
Centaurea pungens	أربع فلافونيد[18]
Centaurea granata	لاكتون سيسكوي تربيني [19]
Centaurea maroccana	مركبين فلافونيدين[20] إثنين لاكتون سيسكوي تربيني[20]

النبتة	المركبات المفصولة
	مركب عطري [20] خمسة مركبات فلافونيدية [21]
Centaurea acaulis	فلافونويد[22] ستة لاكتون سيسكوي تربيني [23] مركب عطري[22]
Centaurea sphaerocephala	أربع مركبات فلافونيدية ألجليكونية [24] مركبين فلافونيدين جليكوزيدين [25]

الجدول(1) الأنواع النباتية و عدد المركبات المفصولة

أما النبتة التي نحن بصدد دراستها فهي نبتة *Centaurea involucrata* نبتة جمعت من نواحي ولاية مسيلة و حسب معلوماتنا البيبليوغرافية لم تدرس هذه النبتة من قبل.

تضمنت هذه المذكرة مقدمة وأربعة فصول و خاتمة حيث شمل الفصل الأول الدراسة النظرية للفلافونيدات من تعريف و أقسام الفلافونيدات إلى الإصطناع الحيوي و المخبري ثم الفصل والتنقية .

الفصل الثاني شمل الطرق الفيزيوكيميائية لتحديد الصيغ الكيميائية للمركبات الفلافونيدية .

الفصل الثالث شمل الحديث عن النبتة المدروسة والطريقة العملية المتبعة في المخبر من الاستخلاص حتى الوصول إلى المركبات المفصولة .

الفصل الرابع تم الحديث فيه عن النتائج المتحصل عليها مع المناقشة .

أما الخاتمة فهي تلخيص للنتائج المحصل عليها.

الفصل الأول المركبات الفلافونيدية

I. الفلافونيدات

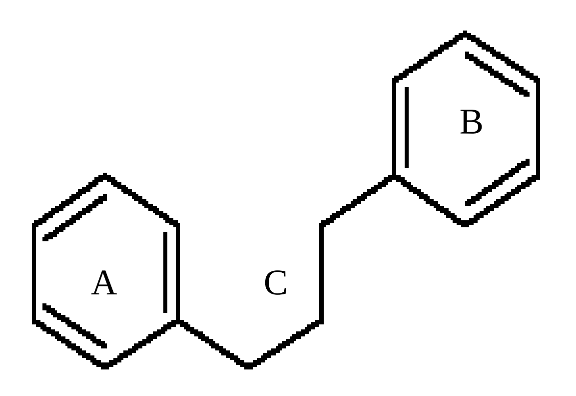
I.1.1.ماهية الفلافونيدات

تعتبر الفلافونيدات الفئة التصنيفية الأكبر للمركبات الفينولية، فهي أحد أفراد مجموعة مركبات بلورية موجودة في النباتات ولقد تم اكتشافها من طرف العالم زينت جيورجي الحاصل على جائزة نوبل عام 1936 في اللب الأبيض للثمار الحمضية، صنفها على أنها فيتامينPثم تبين أنها تزيد من شدة امتصاص الفيتامين C. [26]

الفلافونيدات صبغات نباتية تتواجد في مختلف أجزاء النبات والتي تعطي الأزهار والفواكه وبعض الأوراق ألوانها الزاهية واللون الأصفر يشكل الغالبية للفلافونيدات. [27-28]

يعود أصل تسمية الفلافونيد إلى الكلمة الاغريقية Flavus والتي تعني اللون الأصفر.تسمى أحياناً باسم "بيوفلافونيدات" وعلى الرغم من أن المصطلح فلافونيدات هو الأكثر دقة من الناحية العلمية، إلا أنإسم البيوفلافونيدات يستخدم غالباً لوصف الفلافو نيدات النشطة حيوياً. [27-28]

تتميز ببنية أساسية بسيطة نسبيا، تتكون من 15 ذرة كربون موزعة على 3 حلقات من الشكل $C_6–C_3–C_6$ حلقتين عطريتين Aو B تجمعهماحلقة غير متجانسة C.[29]



الشكل(1)الهيكل القاعدي للفلافونيدات

توجد الفلافونيدات في كافة النباتات الراقية وتنعدم أوتتواجد بصيغ بنيوية بسيطة في النباتات الدنيا [29] على شكل أجليكونات ذوابة في المذيبات الغير قطبية (الفلافونيدات عديدة الميثوكسيل) أو بشكل جليكوزيدات ذوابة في الماء[30] .حيث تكون وحدة السكر مرتبطة إلى ذرة أكسجين لمجموعة الهيدروكسيل مثل مركب rutine أومرتبطة مباشرة بإحدى ذرات كربون الحلقة العطرية،مثل مركب isovitexine الشكل (2) وأغلب السكريات الأحادية المتواجدة في بناء الفلافونيدات هي الجلوكوز والجلاكتوزوالأرابينوزوالزيلوز.

Rutine Isovitexine

الشكل(2)

I.1.2. خصائص الفلافونيدات

- تتواجد في أغلب الأحيان على شكل جليكوزيدات مرتبطة بوحدة سكرأوأكثر .[31-32]
- أصباغ مسؤولة عنإعطاءالألوان المختلفة للنباتات بالإضافة إلى كونها تجذب انتباه الحشرات المساهمة في تلقيح النباتات. [31-32]
- توفر الحماية للنباتات من الأشعة فوق بنفسجية المؤدية. [31-32]
- لما كانت الفلافونيدات مركبات هيدروكسيلية فإنها لا بد أن تتصف بصفات وخواص الفينولات، فهي مركبات ذات صفة حمضية ضعيفة ذوابة في القواعد القوية مثل هيدروكسيل الصوديوم.تتصف الفلافونيدات التي تحمل عدد أكبر من مجموعات الهيدروكسيل الحرة أو مجموعة سكر بالصفة القطبية و عليه فهي تذوب في المذيبات القطبية، مثلالميثانول والإيثانول وثنائي مثيل سلفوكسيد والأسيتون والماء أما الفلافونيدات الأقل قطبية مثل الأيزوفلافونات وكذلك الفلافونات التي تحمل عددا من مجموعات الميثوكسيل فإنها تذوب في الكلوروفورم أو الإيثر .[33]

I.1.3. أهمية الفلافونيدات:

في السنوات الأخيرة كثر الإهتمام بالفلافونويدات بسبب خواصها المضادة للأكسدة، فلقد وجد أن الكثير من هذه المركبات أكثر فاعلية في تأثيرها من مضادات الأكسدة المعروفة، فالخاصية الرئيسية للفلافونويدات هي قدرتها على أكسدة الجدور الحرة للأكسجين و التي هي مصدر لتدهور العديد من الجزيئات الحيوية المؤكسدة مثال الدهون غير مشبعة والبروتينات و الأحماض النووية ...

❖ **الوقاية من احتشاء عضلة القلب**

أثبتت تجارب أجريت على الفئران من طرف باحثين في مختبرات TIMC تابعة للإتحاد الأوروبي، أن النظام الغذائي الغني بالفلافونيدات خاصة الأنتوسيانين لها أثار وقائية من إحتشاء عضلة القلب L'infarctusdu myocarde في انتظار تعميم هذه النتائج على البشر.[34]

❖ **الوقاية من الإصابة بمرض السكري**

تمنع بعض الفلافونيدات الإصابة بمرض السكري أو الإنقاص من الإصابة به وهذا عن طريق قدرتها على تثبيط الإنزيم المسبب له Aldose réductase[35].

❖ **مضادة للفيروسات**

تثبيط Neuraminidase فيروسات الأنفلونزا وفعالية التثبيط مرتبطة ببنية المركب حيث تكون فعالية
Aurones>Flavonoles>Iso flavones>Flavanonoles ,Flavanoles
فهناك وظائف ضرورية لإحداث النشاط C_4O، 4'-OH ,7-OH .[36]

❖ **مضادة للإلتهابات**

تثبيط انزيم Cyclooxygénase و Lipooxygénase وسطاء لحدوث الأيض الذي ينتج عنه Acide arachidonique المسبب للحساسية وفي المقابل تحرير Leucotriènes الذي يؤدي إلى تقليل التشنجات و الإحمرار... و على عكس غيرها من مثبطات cyclooxygénase لا تؤدي إلى حدوث تقرحات على مخاطية الأمعاء.[37]

❖ **وقاية الشعيرات الدموية**

الفلافونيدات تقلل من نفادية الشعيرات الدموية و تزيد من مقاومتها، حيث يتم الجمع بين الفيتامين C و فيتامين النفادية P (perméabilité) كعامل مساعد للفيتامين C فيزيد من إمتصاصه وهذه هي فائدة الجمع بينهما .[38]

❖ **فعالية على مستوى الهرمونات(الإستروجان)**

هناك فلافونيدات تعمل على مزيد من التوازن بين الأستروجان المفيد و الأستروجان الضار حيث أن زيادة الأستروجان المعروف بإسم الإستراديول ، قد يتسبب في حدوث أنواع من السرطانات و الإضطرابات الهرمونية فالفلافونيد يساعد الجسم على تحويل الاستراديول إلى إستيريول وهو صورة آمنة من الاستروجان أي الصورة المفضلة له، يستخدم في الغرب للعلاج الهرموني البديل وتستعمل عادة الفلافونيدات مع فيتامين Cحيث إنها تزيد من امتصاصه.[28]

❖ **الوقاية من تصلب الشرايين**

تصلب الشرايين مرتبط بالجدور الحرة فالفلافونيدات لها فعالية ضد انزيم Cyclooxygénase فتحي استجابة البطانة والحد من تأكسد الكوليسترول المنخفض الكثافة، دراسة هولندية أظهرت انخفاض معدل الوفيات بالشريان التاجي (Coronarienne)لمستهلكي الفلافونيدات ذات الأصل الطبيعي.[38]

❖ **مكافحة السرطان**

للفلافونيدات أثر ضد نشاط انزيم TopoisoméraseIIالذي يلعب دور أساسيا في تطور مرض السرطان فقد أظهرت الفلافونيدات أن لها قدرة وقائية ضد العديد من أنواع السرطانات كسرطان البروستات و الكولون و الرئة [39].

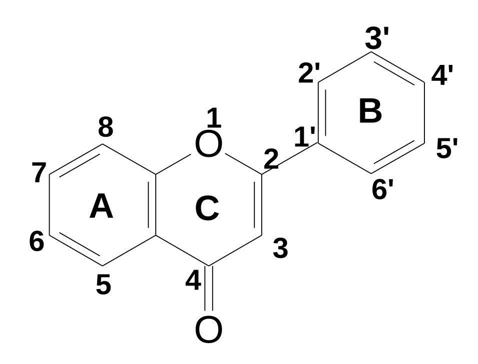
I.4.1. أقسام الفلافونيدات:

يمكن تقسيم الفلافونيدات حسب:

1. **جهة ارتباط الحلقة Bبـ C.**
2. **درجة تأكسد الحلقة C.**

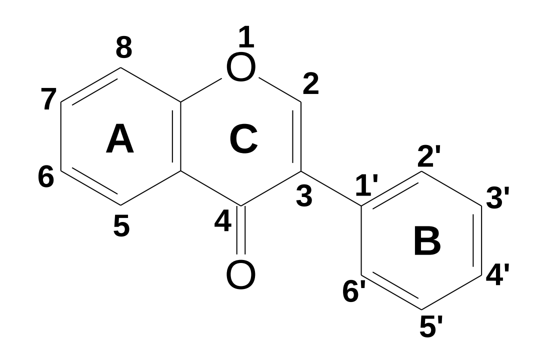
1. حسب جهة ارتباط الحلقة Bبـ C

❖ **فلافونيدات:** إذا كان ارتباط الحلقة B مع الحلقة C في الكربون 2.الشكل(3)



الشكل (3) فلافونيد

❖ **إيزوفلافونيدات:**إذا كان ارتباط الحلقة B مع الحلقة C في الكربون 3.الشكل(4)



الشكل(4) إيزوفلافونيد

2. حسب درجة تأكسد الحلقة C

❖ بعض أقسام الفلافونيدات مبينة في الجدول (2)

Groupe	Structure de base	Exemples
Flavone		Luteoline Apigènine Tangeritine
Flavonol ou 3-hydroxyflavone		Quercetine KaempferolIsorhamneti ne PachypodolRhamnazin e
Flavanone		Hesperetine Naringenine Eriodictyol
Flavanonol ou 3-Hydroxyflavanone		Taxifoline Dihydrokaempf-erol

الجدول (2) بعض أقسام الفلافونيدات

❖ الأنطوسينيدين(Anthocyanidine)

أنطوسينيدين يتميز بغياب الوظيفة السيتونية في الموقع4، بالإضافة إلى وجود رابطة ثنائية في الموقع O_1-C_2 و كذلك في الموقع C_3-C_4.الشكل(5)

الشكل(5) نواةAnthocyanidine

الجدول(3) يمثل أهم مركباتAnthocyanidine

R3'	R5'	
H	H	Pélargonidine
OH	H	Cyanidine
OCH_3	H	Paeonidine
OH	OH	Delphinidine
OCH_3	OCH_3	Malvidine
OH	OCH_3	Pétunidine

الشكل (6)

الجدول(3)

❖ الفلافانول(Flavan-3-ol)

يتميز هذا النوع بغياب الوظيفة السيتونية في الموقع 4 مع وجود مجموعة هيدروكسيل في الموقع 3 وهو مايوضحه الشكل(7).

Flavan-3-ol

الشكل(7)

❖ الشالكــون(Chalcone)

تتميز هذه المركبات بغياب الحلقة **C**

Chalcone

Dihydrochalcone

الشكل (8)

الشكل(9)

الأورون(Aurone)

مركبات تتميزبكون الحلقة C خماسية وهو مايوضحه الشكل(10).

Auroune

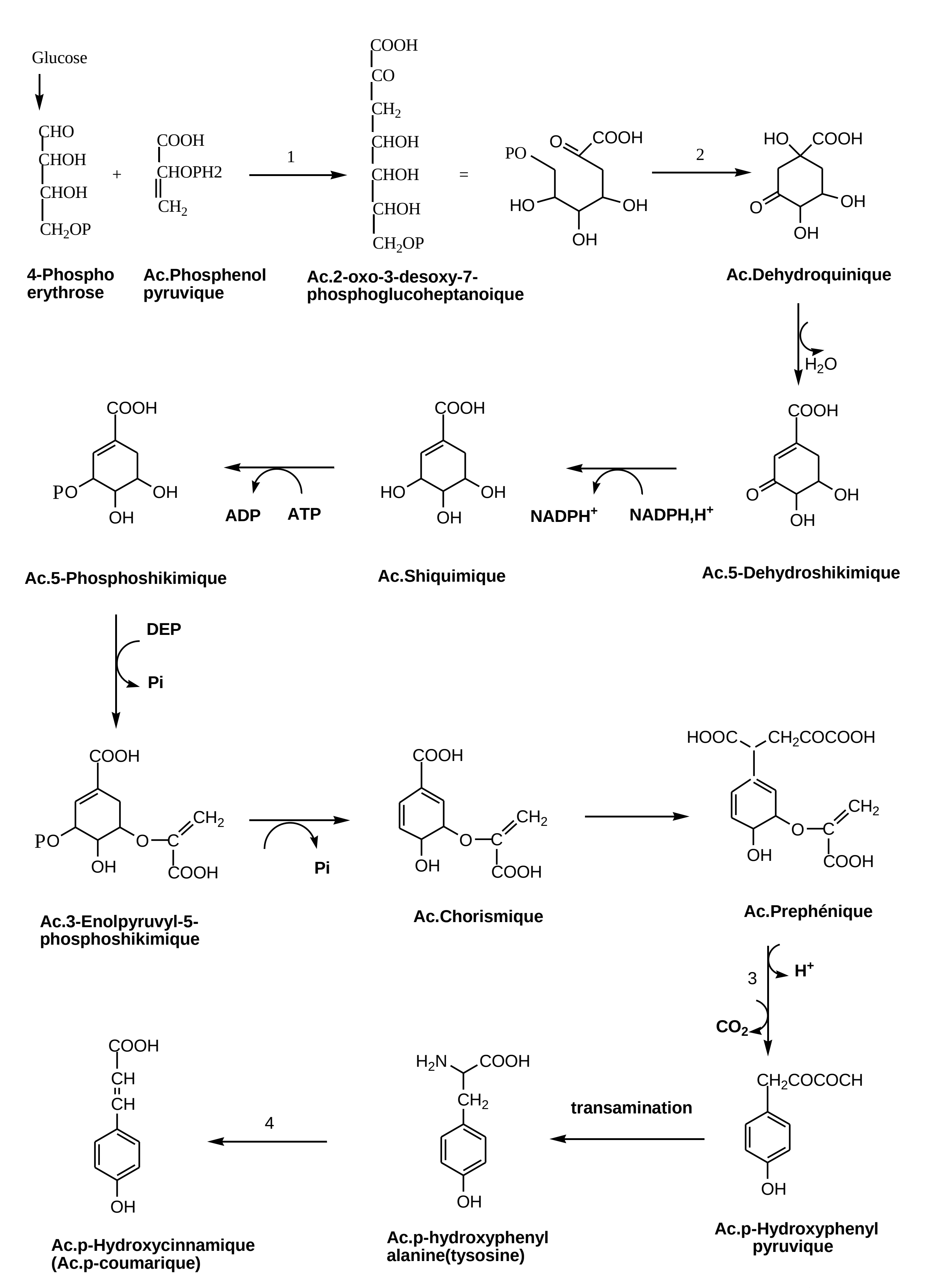
الشكل(10)

I.2 .1.الإصطناع الحيوي:

الاصطناع الحيوي للمركبات الطبيعية هي طريقة تكوين هذه الأخيرة داخل مصادرها الطبيعية و ذالك عن طريق تفاعلات الأكسدة والإرجاع بمساعدة إنزيمات خاصة، فلقد أجريت تجارب باستعمال ^{14}C حيث لاحظ العالم Robinson سنة 1936 [40] أن استبدال النواتين البنزينيتين للمركبات الفلافونيدية مختلف جوهريا مما يستلزم أنه ليس لهما نفس الأصل الوراثي الحيوي، و بمواصلة التجارب تم التوصل إلى أن الاصطناع يتم خلا ل ثلاثة مراحل هي:

I.1.1.2.المرحلة الأولى:

- طريق حمض الشيكيميك:أثبت العالمDavisسنة1955 دور حمض الشيكيميك في تكوين الحلقة(B) والسلسلة الكربونية(C_3)انطلاقا من الجليكوزوهذا مايوضحه الشكل(11) حيث تم عزله أول مرة من نبتة يابانية *Illicium anisatum Shikimi- no-ki* ومنه إشتق إسمه [41].



الشكل (11) تكوين حمض Ac.p-coumarique انطلاقا من الجلوكوز مرورا بحمض الشيكميك

الجدول (5) الأنزيمات المرقمة من 1 إلى4 على (الشكل11) هي:

1	Aldolase, 3-désoxy-o-arabinoheptulosonate-7-phosphate synthase ou DHAP synthase
2	Déshydroquinate synthase
3	Préphénate déshydrogénase
4	Tyrosine ammonia-lyase

الجدول (5)

ثم يتحول الناتجAc.p-coumaroyl(Ac.coumarique) إلى)(p- coumaroyl- CoA وهو مايوضحه الشكل (12).

OH
CoA
OH
CoAS
C
HOOC
O
Ac.p-coumarique
p-coumaroylCoA

الشكل(12) تحول Ac.p coumarique إلىP-coumaroylCoA

2.1.2.I.المرحلة الثانية :

- طريق الخلات :

يتم تثبيت مجموعة الكاربوكسيل مع أستيل مرافق انزيم(Acyètyl-CoA) فينتج عنه وحدة (Malonyl-CoA) و هو مايوضحه الشكل (13).

H_3C — C(=O) — S — CoA + CO_2 → (ATP → ADP) HO — C(=O) — CH_2 — C(=O) — S — CoA

acetyl CoA

malonyl CoA

الشكل(13) تشكيل Malonyl-CoA انطلاقا من Acétyl-CoAوCO_2

3.1.2.Iالمرحلة الثالثة:

- طريقة الشالكون:

تتكاثف ثلاث وحدات من Malonyl-CoA فتتشكل الحلقة(A) [42] و اتحاد الناتج مع حصيلة المرحلة الأولى(p-coumaroyl-CoA) يعطي الشالكون و هو النواة الأساسية التي تنحدر منه مختلف هياكل الفلافونيدات كما هو موضح في الشكل (14)[43].

3 × Malonyl-CoA

- 3CoA-SH

-3 H_2O

p-coumaroyl-CoA

Chalcone

Flavanone

الشكل(14)

يتبع

Chalcone

Chalcone-isomerase

Flavanone:Naringénine

flavone-synthase

Flavone:Apigénine

(2S)-Flavanone-3-hydroxylase

Dihydroflavonol:(2R,3R)-dihydrokaempférol

Flavonol-synthase

Flavonol:kaempférol

Dihydroflavonol-4-réductase

Flavan-3,4-diol:Leucopélargonidol

Flavan-3-ol:afzéléchol

Anthocyanidol:pélargonidol

3-O-glucosyl-transférase

Anthocyanoside:pélargonidol-3-O-glucoside

تابع الشكل (15) الإصطناع الحيوي لمختلف الهياكل الفلافونيدية إنطلاقا من الشالكون. [43]

I.2.2 تثبيت المجموعات الاستبدالية على الهيكل الفلافونيدي

I.2.2.1.تثبيت مجموعات الهيدروكسيل:

إن تثبيت المجموعات الهيدروكسيلية في الموضعين 5 و 7 يتم قبل تشكيل الحلقة A، و لهذا يعتبران من المجموعات الأصلية للحلقة A.[29]
أما بالنسبة للحلقة B فإن هيدروكسيل الموقع '4 يظهر قبل تكوين نواة الشالكون .[29]
أما تثبيت مجموعة هيدروكسيل في الموقع '3 و '5 فيتم بعد غلق الحلقة C.[43-44]
تثبيت مجموعة هيدروكسيل الموقع 3 يتم في مرحلة تشكيل الشالكون.

I.2.2.2.تثبيت مجموعات الميثيل:

إن تثبيت الميثيل يأتي بعد تثبيت الهيدروكسيل و يتطلب وجود إنزيم O-méthyl-transférase و مانح للمثيل (SAM) فهذه العملية تتم قبل تكوين الشالكون أو بعد تكوين الفلافونيد في وجود المانح للمثيلومثال عن ذلك تثبيت مثيل الموضع ميتا ('3) على الحلقة B في مركب Lutéolineكما يوضحه الشكل (16).[44]

الشكل(16)تثبيت مجموعات الميثيل

كما يمكن ظهور مجموعات ميثوكسي عن طريق المثيلية المباشرة على الحلقة البنزينية[45].

3.2.2.I.تثبيت جزيئات السكر:

توجد المركبات الفلافونويدية على هيئة جليكوزيدات، أي تدخل وحدات سكرية في بناءها والتي تثبت على الأجليكون بطريقتين:

❖ الطريقة الأولى:

تثبيت جزيئية السكر على الأجليكون بحيث تتشكل الرابطة في هذه الحالة بين ذرة الكربون الأنوميري C_1 لجزيء السكر غالبا يكون Glucose أوGalactose أو أحد البنتوزات و كربون الحلقتينA(و/أو) B[46-47]تنشأ بهذارابطة من نوع كربون . كربون بعد تكوين الشالكون مباشرة وهي رابطة مقاومة للأحماض والارتباط عادة ما يكون في الموقعين C_6 و/أو C_8 للأجليكون الذي غالبا يكون فلافونا.

vitexine

الشكل (17)

الطريقة الثانية:

و فيـــه تـــرتبط جزيئيـــة الســـكر بـــذرة أكســـجين مجموعـــة الهيدروكســـيل مباشـــرة أي مـــن نـــوع (O-heterosidique) وعادة يكون التثبيت عند هيدروكسيل الموقع 7 للفلافونات و هيدروكسيل الموقع 3 في وجود أنزيم"O-glucoside-transférase" و مانح للسكر مثل :

(Uridine diphosphate glucose)"UDP-glu" .[48] الشكل(18)

من أشهر السكريات التي ترتبط بهيدروكسيل الفينول للأجليكول نجد:

Hexoses(D-glucose، D-galactose أو D-allose) و Pentoses (D-apioses، L-arabinose، L-rhamnose، D-xylose).

الشكل(18) تثبيت جزيئات السكر في وجود إنزيم ومانح السكر

I.3.الاصطناع المخبري:[49]

توجد نظريا طريقتين للتصنيع المخبري للفلافونيدات وهي:

❖ **التكاثف الألدولي:**

الشكل (19)

❖ **أسألة الفينولات:**

الشكل (20)

I.3.1.تصنيع الشالكون:

يمكن الحصول على الشالكونات و ذلك بالتكاثف الألدولي لـ :

2-hydroxyacetophenoneمع المشتقات البنزينية الألدهيدية (benzenaldehydes)في الوسط الحمضي أو القاعدي الشكل(21).

تحدث عملية تحلق للشالكون و ذلك في الوسط الحمضي الذي يؤدي إلى ظهور الفلافانون وفق تفاعل متوازن (شالكون– فلافانون)، إلا أن هذا التوازن ينزاح بشكل شبه كلي إلى جهة الشالكون و هذا في حالة وجود هيدروكسيل حر في الموقع 4 بالنسبة للشالكون.

التفاعل في الوسط القاعدي يجرى تحت الشروط التالية:

- درجة الحرارة0° م –20°م
- تركيز القاعدة KOH 50%- 60%
- الزمن اللازم للتفاعل 15- 48 ساعة

و قد لوحظ أن انعدام مجموعات الميثيل يؤدي إلى مردود جيد.

HO OH MeO Me O + H O → 0° - 5° NaH 8 Jours → HO OH Me O

الشكل(21)

من أجل الحصول على الشالكونات ذات مجموعات الميثيل انطلاقا من الفلافانون و ذلك بفتح الحلقة في الوسط القاعدي الكحولي ثم الترسيب بالحمض الممدد و تحت حرارة منخفضة و للحصول على مردود جيد ينبغي عدم وجود هيدروكسيل حر في الوضع 5 بالنسبة للفلافانون.

I.2.3.تصنيع ثنائي هيدروشالكون :

نتحصل على ثنائي هيدروشالكون وذلك من تكاثف الفينولات مع مشتقات حمض ثنائي هيدرو سيناميك (acide dihydrocinnamique) أو بهدرجة الشالكون أو الفلافانون الشكل(22).

Zn

AcOH anhy

الشكل (22)

I.3.3.تصنيع الفلافونوهو مايوضحه الشكل (23) والشكل (24).

$Br_2.CaCO_3$

الشكل(23)

NBS

CCl_4

	R_1	R_2
a	Ac	H
b	Me	Ac
c	Ac	Me

	R_1	R_2
A	H	H
B	Me	H
C	H	Me

1) I_2.AcOH
2) AcONA. AcOH anhy
3) MeONa

R_1 = Sucre
R_2 = Ac ou Me

R_1 = Sucre
R_2 = H ou Me

الشكل(24)

4.3.I.تصنيع الفلافانون:

انطلاقا من الشالكون يتم الحصول على الفلافانون و هذا بغلق الحلقة و قد لوحظ أن وجود هيدروكسيل حر في الموضع 6′ بالنسبة للشالكون يؤدي إلى مردود جيد و يمكن أن نذكر أيضا أن الفلافانون المستبدل في الموضع 8 لا يمكن الحصول عليه إلا تحت شروط قاسية الشكل(25).

الشكل(25)

بعض التفاعلات الخاصة التي تمكننا من الحصول على فلافانون خاص وهو مايوضحه الشكل(26).

	R_1	R_2
a	Bz	Me
b	Me	Bz

	R_1	R_2
A	H	Me
B	Me	H

الشكل(26)

I.5.3.تصنيع الفلافونول و الأورون:

الشكل(27)

لوحظ أن شروط التفاعل و وجود المستبدلات لها تأثير كبير على مردودية التفاعل، فبالنسبة للمستبدلات لوحظ أن وجود هيدروكسيل في الموقع 2 و الموقع 4 بالإضافة إلى مجموعة ميثوكسيل في الموضع 6´ فإن مردود التفاعل يزيد باتجاه الحصول على الفلافونول المطلوب.

أما الشروط المثالية: H_2O_2 5% - 30%، NaOH 20%

I.6.3.تصنيع ثنائي هيدرو الفلافونول:

الشكل (28)

يمكن إجراء الخطوة الثانية من هذا التفاعل في وجود حمض HClالمركز أو يمكن استعمال HCl النقي و حمض الخل البلوري و هذا بوجود BF_3 و الإثير كمذيب.

7.3.I.تصنيع الأورون:

الطرق العملية المستعملة تقريبا كلها تعتمد أساسا على تكاثف الكومارين مع الألدهيدات العطرية في وسط حمضي إلا أنه في حالة وجود سكريات كمستبدلات لا يمكن استعمال هذه الطريقة التي تتطلب وجود حمضHClلذا فإننا نلجأ إلى تفاعلات أخرى.

الشكل(29)

8.3.I.تصنيع إيزوفلافون:

❖ **الطريقة الأولى:**

الشكل (30)

❖ **الطريقة الثانية:**

الشكل (31)

❖ الطريقة الثالثة:[50]

MeO OH O OMe

$HCHO/CHCl_3$
K_2CO_3/H_2O

MeO OH OH O OMe

$HCHO/CHCl_3$
K_2CO_3/H_2O
$(n\text{-}Bu)_4N^+HSO_4^-$

$Et_2NH/EtOH$

MeO O CH_2OH O OMe

K_2CO_3/H_2O
MeOH

MeO O O OMe

الشكل(32)

I.4. الفصـــل والتنقيـة:

I.1.4.الفصل

في سنة 1903تم اكتشاف الكروماتوغرافيا من طرف العالم الروسي twestوهي من أهم الطرق التي يتم بواسطتها فصل وتنقية المركبات الفلافونيدية أهمها:

. كروماتو غرافيا العمود(CC)
. كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة(CCM)
. كروماتوغرافيا الورق(CP)
. كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء)(HPLC

I.1.1.4. كروماتوغرافيا العمودCC:

تستخدم كروماتوغرافيا العمود لفصل الكميات الكبيرة من الفلافونيدات يعبأ العمود بالصنف الثابت الذي يكون سليكاجل أو سليلوز أو بولي أميد. يستخدم السليكاجل لفصل الفلافونيدات الأقل قطبية حيث يؤخذ 32غ منه لكل 1غ من المستخلص الخام على الأقل. في حين أثبت السليلوز فعاليته في فصل الفلافونيدات الجليكوزيدية عن تلك المجردة من السكر ولقد لقي البولي أميد SC_6تطبيقا واسع النطاق في حقل الفلافونيدات, نظرا لكون هذه المادة مناسبة لفصل جميع المركبات الفلافونيدية و على الأخص لفصل الفلافونيدات الجليكوزيدية وهذا لإمتلاك بولي أميد الوظيفة الأميدية التي تكون روابط هيدروجينية مع مجاميع هيدروكسيل المركبات الفينولية [51]. حيث يؤخذ10غ من بولي أميد لكل 1غ من المستخلص الخام على الأقل ونقطة الإختلاف في استعمال هذه المادة مقارنة بالسليلوز والسليكاجلهي أنها تغسل في العمود بالماء و الميثانول قبل تطبيق خليط الفلافونيدات المراد فصله وذلك لتجنب الشوائب التي تذوب في المذيبات المستعملة للتملص. بعد تعبأة العمود يذاب خليط الفلافونيدات في أقل كمية ممكنة من المذيب المناسب و يطبق في العمود ثم تبدأ عملية التملص بالمذيب الأقل قطبية ثم يضاف المذيب القطبي تدريجيا حتى الوصول إلى أقصى قطبية، خلال هذه العملية تتم مراقبة الحزم المنفصلة باستعمال الأشعة فوق البنفسجية، عند استعمال البولي أميد تستقبل أسفل العمود أما عند استعمال سليكاجل يتم فحص و جمع الكسورالمتشابهة باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة .

I.2.1.4.كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM)

تستعمل في هذه التقنية شرائح من الزجاج ذات أبعاد(20×20سم)حيث تحضر طبقة رقيقة من الدعامة الصلبة تكون من متعدد الأميد أو السيليكاجل أو السيليلوز .

يوضع الخليط على طول الشريحة على بعد (1.5−2سم) نتركها تجف، ثم توضع في حوض به المذيب المناسب وأثناء هجرته يجر معه مختلف المركبات على شكل حزم ، تحدد بعد ملاحظتها بالأشعة فوق البنفسجية(UV).

تكشط الحزم كلا على حدى. توضع في قمع زجاجي تغسل أولا بالمذيب المستعمل و الثانية بالمثانول، يركز الراشح وتفحص نقاوة الحزم بكروما تو غرافيا الطبقة الرقيقة التحليلية .

الأنظمة المستعملة كمذيبات :[52]

الجدول (6)بالنسبة لمتعدد الأميد:

جملة المملصات	نوع الفلافونويد
اسيتيل أسيتون: ميثيل إيثيل سيتون: الميثانول: الماء المقطر 13 3 3 1	الغليكوزيدية
المياثانول : ميثيل إيثيل سيتون : الإيثر :الطولوين 60 2 10 10 المياثانول : ميثيل إيثيل سيتون : الهكسان :الطولوين 30 90 2 1.5 المياثانول : ميثيل إيثيل سيتون : الطولوين 4 3 3	الأجليكونية قليلة الهيدروكسيل
الماء المقطر: حمض الخل :الميثانول 18 1 1 حمض الخل: البوتانول العادي : الإيثانول : الماء المقطر 50 25 20 2	الأجليكونية متعددة الهيدروكسيل

الجدول (7)**بالنسبة للسيلكاجال :**

جملة المملصات	نوع الفلافونويد
الميثانول: الماء المقطر: البيريدين: خلات الإيثيل 80 20 10 5	الغليكوزيدية
الميثانول :الكلوروفورم 15 1	الأجليكونية قليلة الهيدروكسي
الطولوين: أسيتون:الكلوروفورم 7 5 8 الماء المقطر : الميثانول : خلات الإيثيل 63 12 9	الأجليكونية متعددة الهيدروكسيل

I.3.1.4. كروماتوغرافيا الورقة التحضيرية CP

هذه الطريقة تعتبر من أهم طرق فصل المركبات الفلافونيدية، نظرا لقدرة الإدمصاص الكبيرة يأخذ ورق WATMAN رقم I أو II يوضع المستخلص بواسطة ماصة على كامل عرض الورقة على شكل شريط، حيث يكون على بعد 02 سم من الحافة العلوية 03 سم على الحواف الجانبية وبعد أن تجف تغمس في المملص المناسب للفصل، حيث تفصل المركبات على شكل حزم متتالية مع الإشارة هنا أنه يمكن استعمال نوعين من الكروماتوغرافيا.

كروماتوغرافيا الورق الصاعدة و كروماتوغرافيا الورق النازلة هذه الأخيرة الأكثر استعمالا.

بعد وصول المذيب إلى مسافة قصيرة من الحافة السفلية(تدوم هذه العملية من 05 إلى 20 ساعة) تسحب الورقة من المذيب وتترك لتجف .

بعدهاتحدد الحزم باستعمال الأشعة فوق البنفسجية (UV).

ثم تقص و تغمس في الميثانول، بعدها ترشح و تركز ثم يجرى لها فحص بإستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة للتأكد من مدى نقاوة المركبات المحصل عليها.

الأنظمة المستعملة في هذه التقنيةهي:[53]

الماء المقطر: حمض الخل:البوتانول العادي.

5 1 4

الماء المقطر:حمض الخل:البوتانول الثالثي.

1 3 1

حمض كلور الماء:الماء المقطر:حمض الخل.

30 10 3

الماء المقطر:حمض الخل. حمض الخل

25 10 تراكيز مختلفة.

90 75

هذه التقنية يمكن إستعمالها ببعدين يكون أحدهما عموديا على الأخر وهذا عندما يكون استخدام بعد واحد غير كافي لفصل الخليط فبعد إجراء البعد الأول تسحب الورقة ، تترك لتجف ثم تدار بمقدار °90 ثم تغمس في المذيب آخروعادة يكون الأول عضوياوالثاني مائيا.

4.1.4.I كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء :

تسمح هذه التقنية بتعيين عدد المركبات التي تحتوي عليها العينةالمراد تحليلها في وقت قصيرحيثتستخدام ضغوط عالية لدفع المذيب خلال العمودفيجر معه المركبات بصفة انتقائيةفتفصل المركبات الأكثر قطبية ، تليها الأقل لذا فهي نوع من أنواع التحليل الكروماتوغرافي التجزيئي. و المملص المستعمل يتكون من مذيبين AوB حيث :

A) الماء / الأسيتونتريل / حمض الخل : 90 / 10 / 4.

B) الماء / الأسيتونتريل / حمض الخل : 20 / 80 / 4.

و ذلك وفق برنامج يحدد نسب تدفق هذين المذيبين.

2.4.I.التنقية:

الهدف من التنقية هو التخلص من الشوائب العالقة بالمركبات المعزولة إذن فهي عملية مكملة لعملية الفصل و هذا باستعمال.

عمود صغير من متعدد الأميد SC_6نذيب المركب المفصول في قليل من الميثانول يغسل بالطولوين ثم نغير الملمص بإضافة المثانول تدريجيا، نتتبع نزول المركب بمصباح UV.

كما يمكن استعمال عمود من السفاداكسLH20 يتم نقع جال السيفاداكس في الميثانول ثم يصب في العمود و بعد تموضعه، نذيب المركب المفصول في أقل كمية من الميثانول يوضع في العمود يملص بدفعات متتالية من المثانول .

الفصل الثاني الدراسة البنيوية للمركبات الفلافونيدية

الدراسة البنيوية للفلافونيدات تتم اعتماداعلى التقنيات التالية :

1.الخواص الكروماتوغرافية :

- **اللون الاستشعاعي**
- **ثابت الاحتباس**

2.التقنيات الفيزيوكيميائية :

- **مطيافية الأشعة فوق البنفسجية**
- **مطيافية الرنين النووي المغناطيسي**
- **مطيافية الكتلة**

3.الإماهة الحمضية

II.1.الخواص الكروماتوغرافية:

II.1.1.اللون الإستشعاعي:تتميز الفلافونيدات بأنّها تعطي ألوانا معينة تحت الأشعة فوق البنفسجية و التي تساعدنا على التعرف على نوع الفلافونويد[51]ونلخصها بصفة عامة في الجدول (8).

لون المركب تحت الأشعة فوق البنفسجية(UV)	البنى الكيميائية المختلفة
بنفسجي–أسود.	. فلافون. .5،6،7 أو 5،7،8 ثلاثي هيدروكسيل فلافون. . فلافونول مستبدل في الموضع 3. . بعض الشالكونات.
بنفسجي–نيلي.	. فلافانون يملك هيدروكسيل في3أوفلافانول. . فلافون أو فلافانون دون OH في5. . فلافونول مستبدل في 3أو دون OHفي5.
أصفر أو أصفر باهت.	. فلافونول مع OHحر في3 أو دون OHفي5.
برتقالي لامع.	.إيزوفلافون.
أصفر مخضر.	. أورون.
أخضر.	. بعض الشالكونات.
أزرق مخضر.	. فلافانوندونOHفي5.

الجدول(8)لون المركب تحت الأشعة فوق بنفسجية (UV) وعلاقته بالبنية الفلافونيدية

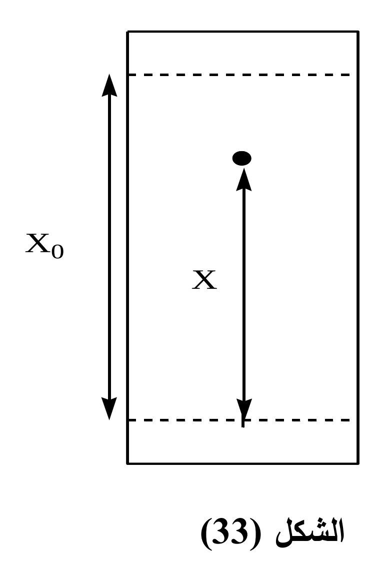
II.2.1. معامل الإنحباس:

R_f هو قيمة مميزة لكل مركب في شروط كروماتوغرافية معينة (درجة الحرارة، طبيعة المادة الدامصة، والمملص). وتتأثر هذه القيمة بالمستبدلات ومواقعها على الجزئي فمن خلالR_f يمكن التمييز بين الجليكوزيدات أحادية، ثنائية و متعددة السكر [51] و بين الأجليكونات البسيطة ومتعددة الهيدروكسيل أو متعددة الميتوكسيل.

يعرفR_f بأنه: $R_f = x / x_0$

حيث:x هي المسافة المقطوعة من طرف المركب.

x_0 هي المسافة المقطوعة من طرف المذيب ابتداء من نفس النقطة.



الشكل (33)

II.2.التقنيات الفيزيوكيميائية

II.2.1. مطيافية الأشعة فوق بنفسجية(UV)

يتم تحقيق السلسلة الطيفية اللأشعة فوق البنفسجية عمليا على المراحل التالية :

- نقوم أولا بقياس وتسجيل الطيف المثانولي الخالص للمركب .
- نضيف لخلية المركب قطرة من NaOH بتركيز 0.5 عياري.
- نسجل طيف الامتصاص ثم نعيد تسجيله بعد 5 د.
- نحضر خلية جديدة تحتوي على المركب و نضيف إليها بعض القطرات من $AlCl_3$ ذو التركيز 2% في الميثانول و نسجل طيف الا متصاص ثم نضيف قطرة من HCl (2N) و نسجل طيف الامتصاص.
- نحضر خلية جديدة تحتوي على المركب المدروس نضيف لها NaOAc الصلب حتى التشبع و نسجل طيف الامتصاص ثم نضيف الخلية H_3BO_3 (H_2O 1%) ونسجل الطيف الامتصاص.

II.1.1.2.طيف الامتصاص في الوسط الميثانولي:

يظهر في هذا الطيف و في حالة فلافون أو فلافونول عصابتين أساسيتينوفق الشكلالتالي:

Benzoyle

Cinnamoyle

الشكل(34)الشكلين السيناموبلي والبنزيلي

العصابة I

تظهر بين (300−400 نم) وتعود إلى امتصاص الشكل Cinnamoyle الموضح في الشكلالسابق و الذي ينتج عن ترافق مجموعة كربونيل C_4 مع الحلقة البنزينية B والرابطة الثنائية للحلقة غير المتجانسة المركزية.

العصابةII:

في حدود (250 -280 نم) و يكون مسؤول عنها الشكل الرنيني Benzoyle و الذي ينتج عن ترافق مجموعة كربونيل C_4 مع الحلقة البنزينية .A[48]

- من خلال العصابة (I) في طيف الميثانول [43] يمكن التمييز بين بنية الفلافون والفلافونول إذ أن حزمة (I) تظهر بين [305-350نم] بالنسبة للفلافون وعند [350-380نم] بالنسبة للفلافونول.
- يرتبط مكان الحزمتين على عدد وموقع مجموعات الهيدروكسيل البديلة، فكلما زادت مجاميع الهيدروكسيل، فإن حزمة الامتصاص تزداد، إلى طول موجي أعلى أي (انزياح باتوكرومي) وعند استبدال مجموعات الهيدروكسيل بمجموعات ميتوكسيل أو وحدات سكر تزاح حزمتا الامتصاص إلى طول موجي أقل (انزياح هيبسوكرومي) [33].

الجدول (9) يبين أهم الإنزياحات للعصابتين في الوسط الميثانولي[51].

العصابة I (نم)	العصابة II (نم)	نوع الفلافونويد
350-310	280-250	فلافون.
360-330	280-250	فلافونولهيدروكسيلي الموضع3 مستبدل.
385-350	280-250	فلافونولهيدروكسيلي الموضع3حر.
330-310 نتوء	275-245	إيزوفلافون.
390-340	270-230 شدة منخفضة	شالكون.
430-380	270-230 شدة منخفضة	أورون.
560-465	280-270	أنتوسيانيدين و أنتوسيانين.

الجدول(9) أهم الانزياحات للعصابتين في الوسط الميثانولي[51].

2.1.2.II.طيف الامتصاص في وجود NaOHأوNaOMe

تعتبر NaOH أوNaOMe() قاعدة قوية تؤين جميع هيدروكسيدات المركب الفلافونويدي يكون تأثيرها على العصابة I أكبر منه على العصابة II تؤدي إلى انزياح باتوكرومي لكامل الطيف.[54]

II.3.1.2.طيف الامتصاص في وجود NaOAc

خلات الصوديوم أساس ضعيف مقارنة مع NaOH وبالتالي فهي تؤين مجموعات الهيدروكسيل الأكثر حامضية في المواضع C_3, C_4, C_7 وتعتبر كاشف نوعي لهيدروكسيل الموقع C_7 ويظهر واضحا على العصابة II للطيف المسجل، إذ أنه يحدث فعل باثوكرومي [+5 إلى +20 نم] للعصابة (II) و يشير هذا إلى وجود OH حر في الموضع C_7.[55]

II.4.1.2.طيف الامتصاص في وجود($NaOAc + H_3BO_3$)

تستعمل للكشف عن أورتو ثنائيالهيدروكسيل حيث يشكل حمض البوريك معقدات مع الهيدروكسيلات الفينولية في الموضع أورتو وفي وجود الخلات، يؤدي إلى إنزياح باتو كرومي [51] كما مبين في الشكل(35):

الشكل(35)المعقدات المتشكلة بين الفلافونويد و $NaOAc + H_3BO_3$

II.5.1.2.طيف الامتصاص في وجود $AlCl_3$و($AlCl_3$+HCl)

في وجود $AlCl_3$: يشكل$AlCl_3$معقدات ثابتة بين كربونيل الموضع 4 و هيدروكسيل الموضع 3 أو(و) الموضع 5 في الوسط الحمضي أي بعد إضافة HCl، و معقدات غير ثابتة في الوسط الحمضي مع المركبات المحتوية على هيدروكسيل حر في ('3 ، '4) ،(7 ، 8) ،(6 ،7).

في وجود($AlCl_3$+HCl) : نقارن الطيف المسجل في وجود $AlCl_3$مع المسجل بعد إضافةHClفيكون انزياح هيبوسكرومي للعصابة(I) في حالة وجود معقد غير مستقر و هذا معناه وجود أورثو ثنائي هيدروكسيل على الحلقة A وB[26] و بذلك يكون طيف $AlCl_3$ الممثل لتأثير كل المعقدات الثابتة و غير الثابتة أما طيف ($AlCl_3$+HCl) فطيف المعقدات الثابتة فقط. كما مبين في الشكل(36).

الشكل(36)المعقدات الثابتة وغير الثابتة بين $AlCl_3$بعض الفلافونيدات في وجود وغيابHCl

يتبع

تابعالشكل(36)المعقدات الثابتة وغير الثابتة بين $AlCl_3$بعض الفلافونيدات في وجودوغيابHCl

الجدول(10) يمثل أهم التأثيرات المختلفة للكواشف على طيف الأشعة فوق البنفسجية .

المفاعلات	**الإزاحة الملاحظة بـ (nm)**		**التعليل**
	الحزمة I	**الحزمة II**	
MeOH	350 - 304	280 - 250	فلافون
	385 - 352	280 - 250	فلافونول
	357 - 328	280 - 250	OR في الموضع 3
NaOMe (NaOH)	+45 إلى +65 1- عدم نقصان الشدة الضوئية/MeOH 2- نقصان الشدة الضوئية/MeOH		OH في '4 OR في ’4
	استمرار التناقص في الشدة الضوئية، طيف يتحلل مع الوقت		OH في 3، '4 أو Orthodi-OH على الحلقة A مثلاً 7، 6 أو 8، 7 أو Orthodi-OH على الحلقة B
	استمرار التناقص في شدة الامتصاص مع تفكك سريع للطيف		Tri OH 3، '3، '4 أو Tetra OHفي3، '3، '4، '5
	عصابة جديدة بين 320 - 335		OH في 7

NaOAc		+5 إلى +20	OH في 7 مع ملاحظة أن هذا الانزياح يتراجع في وجود مستبدلات 6 أو 8
		عدم وجود أي انزياح أو ظهور انزياح ضعيف	OR في 7
		طيف يتفكك بمرور الزمن	Di OH في 7، 6 أو 8، 7 أو 4'، 3' Tri OH في 7، 6، 5 أو 8، 7، 5 أو 4'، 3'، 3
NaOAc + H_3BO_3	+12 إلى +36		Orthodi OH على الحلقة B
MeOH/ NaOAc + H_3BO_3		+10 - 15	Orthodi OH على الحلقة A (6-7 أو 7-8) إيزوفلافون
MeOH/ $AlCl_3$ +HCl	+17 إلى +20		5-OH مع مجموعة أكسجينية في 6
	+35 إلى +55		OH في 5 فلافون و OCH_3 في 3 فلافونول
	+50 إلى +60		OH في 3 مع أو عدم وجود OH في 5
$AlCl_3$/ ($AlCl_3$+HCl)	-20 إلى –40 مع نتوء أو قمة من [350 - 360]		Orthodi OH على الحلقة B
	-20 إلى –25		إمكانية وجود Orthodi OH على الحلقة A أكثر من Orthodi OH على الحلقة B أو Tri OH على الحلقة B

الجدول(10)التأثيرات المختلفة للكواشف على طيف الأشعة فوق البنفسجية (UV)[26-51-56]

ملاحظة – : إزاحة هيبسوكرومية + : إزاحة باتوكروميـة

II.2.2.مطيافية الرنين النووي المغناطيسيRMN

استخدمت هذه التقنية على نطاق واسع في دراسة المنتجات الطبيعية فهي تمكننا من معرفة درجة تأكسد الحلقاتA, C,B وكذا عدد ومواقع المجموعات الميثوكسيلية وعدد وطبيعة السكريات الموجودة في المركب. تستخدم في هذه التقنية العديد من المذيبات أهمها: $CDCl_3$ ديوتروكلوروفورم الذي يعطي نتائج جيدة مع الفلافونيدات غير القطبية، و$DMSO-d_6$ (Hexadeuterodimethyl sulfoxide) الذي يستخدم خاصة في حالة الفلافونيدات الجليكوزيدية وكذا الأجليكونات [33-57]

II.2.2.1.طيفRMN للبروتون^1H

فيما يلي الجداول(11)،(12)،(13) تبيّن الانزياح الكيميائي لمختلف بروتونات الحلقتين Aو B[58-26].

الجدول(11)الانزياح الكيميائي لبروتونات الحلقة A

نوع الفلافونيد	H-5	H-6	H-8
5,7-OH	-	*d*(*J* =2,5 Hz) 6,2 –6,0 ppm	*d*(*J*=2,5 Hz) 6,3– 6,5 ppm
5-OH,7-O Glc	-	*d*(*J* =2,5 Hz) 6,1 –5,9 ppm	*d*(*J*=2,5 Hz) 6,1–6,4 ppm
5,6,7-OR (R=H, Glc)	-	-	6,3 ppm (s)
5,7,8-OR (R=Glc,H)	-	6,3 ppm (s)	-
7-OR (R=H, Glc)	*d*(*J*=9 Hz) 8,0 ppm	*d*,*d*(9 Hz, 2,5 Hz) 7,1 –6,7 ppm	*d*(*J*=2,5 Hz) 6,7–7 ppm

الجدول(12)الانزياح الكيميائي لبروتونات الحلقة B أحادية الاستبدال

الفلافونويد	H-5' , H3' d(J= 8,5 Hz)	H-6' , H2' d(J = 8,5 Hz)
فلافون	7,1 - 6,5 ppm	7,9 - 7,7 ppm
فلافونول	7,1 - 6,5 ppm	8,1 - 7,9 ppm

الجدول (13)الإزاحة الكيميائية لبروتونات الحلقة B ثنائية الاستبدال

نوع الفلافونيد	H2' d(J= 2,5 Hz)	H-6' dd(J= 8,5; 2,5 Hz)
Flavone - 3’,4’- OH. - 3’- OMe, 4’- OH. - 3’-OH, 4’- OMe.	7,3 - 7,2 ppm	7,5 - 7,3 ppm
Flavonol - 3’,4’ OH. - 3’-OH, 4’ OMe.	7,7 - 7,5 ppm	7,9 - 7,6 ppm

- **بروتون الحلقةC:** يتأثر بروتون H_3 في الفلافون بمستبدلات الحلقتين العطريتين،يعطي إشارة أحادية حادة في المجال(6.2-6.4ppm) فتكون هناك تداخل مع إشارة بروتوني الحلقة A(H_6,H_8)وبالأخص مع البروتونH_8.[58]

❖ **البروتونات الأليفاتية:**

- **بروتونات مجموعةالميثوكسيل:**

تتمركز إشارات بروتونات الميثوكسيل في المجال[3,8-4,5 ppm]. [58].

- **بروتونات السكر**

يعتمدالانزياح الكيميائي للبروتون الأنوميري"H_1علىطبيعة الفلافونيد و موقع ونوع الرابطة بين السكر والأجليكون.

والجدول(14) يعطي قيم الانزياح الكيميائي للبروتون الأنوميري "H_1 لبعض الفلافونيدات أحادية السكر.

الجدول (14)قيم الانزياح الكيميائي لـ ''H_1 لبعض الفلافونيدات أحادية السكر

δ H_1'' ppm	الفلافونيد
5.2 – 4.8	7-O-glucosyl flavonol
6.0 – 5.7	3-O-glucosyl flavonol
5.3 – 5.1	7-O-rhamnosyl flavonol
5.1 – 5.0	3-O-rhamnosyl flavonol

تستغل قيمة ثابت الاقتران بين"H_1و"H_2 للتعرف على نوع الرابطة(α أوβ) بين السكر والأجليكون.

حيث يمتاز الجليكوز بالرابطة β ويظهر "H_1بإشارة ثنائية وبثابت تزاوج (J=7 Hz) ناتج عن تزاوج ثنائي محوري (diaxial) مع "H_2. أما في حالة سكر الرامنوزحيث يمكن أن تكون الرابطة من النوع α بإشارة ثنائية لـ "H_1بثابت تزاوج (J=2 Hz) نتيجة الاقتران استوائي . استوائي بين"H_2و"H_1. [26].

II.3.2.مطيافية الكتلة:

من التقنيات الفيزيائية المهمة تمكننا من التعرف على البنية الكيميائية للمركب بالإضافة إلى أنها لاتتطلب إلا كمية قليلة من العينة المدروسة (جزء من الملغ) في حين تعطي معلومات كثيرة يمكن معرفة الوزن الجزيئي وبالتالي معرفة الصيغة المجملة للمركب الذي يبين نوعية المستبدلات ميتوكسيلية كانت أو هيدروكسيلية،كما تمكن قيم الشظايا من معرفة توزع هذه المستبدلات على الحلقتين A وB.وتعتمد هذه التقنية على عدة طرق أهمها:

II.1.3.2. طريقة القذف الإلكترونيEI

هذه التقنية تستعمل في حالة الجليكونات ولا تكون صالحة مع الجليكوزيدات لوجود المستبدلات السكرية التي لاتحتمل الطاقة القوية التي تتطلبها هذه التقنية .تتم بقدف المركب بسيل من الإلكترونات داخل غرفة التأين عند درجة حرارة مناسبة.

$$M + 1é \longrightarrow M^{+\bullet} + 2é$$

فيما يلي آليات الانشطار لأهم الشظايا على بعض الفلافونويدات :

m/z = 120 (A_1^{+})
ou/et
m/z = 102 (B_1^{+})

m/z = 105 (B_2^+)

- CO

m/z = 238 (M^+)

- CO

m/z = 77 (B_3^+ -28)

m/z= 105 (B_3^+)

أهم الإنشطارات الملاحظة على الفلافون (تابع)

تطورت مطيافية الكتلة بفضل ظهور تقنيات أخرى.

II.2.3.2. تقنية القذف السريع بالذرات المسرعF.A.B[59]

تستعمل في حالة المركبات الجليكوزيدية حيث يتم تأين المركبات دون تسخين .

II.3.3.2. تقنية الإلكتروسبراي Electro-spray

تسمح هذه التقنية بدراسة الجزيئات ذات الأوزان الجزيئية الكبيرة كالبروتينات تستعمل أيضا الجليكوزيدات .

II.3.الإماهة الحمضية:

تستعمل هذه التقنية للتعرف على طبيعة السكريات الموجودة في المركبات الجليكوزيدية بالإضافة إلى أنها تعطينا فكرة عن نوع الرابطة بين السكر والأجليكون رابطة من نوع (O-glycosyl)أو من نوع (C-glycosyl) لأن الرابطة من النوع الثاني أي (C-glycosyl) مقاومة للتحليل الحمضي .حيث يتم تمييه المركب الجليكوزيدي في وسط حمضي لتحطيم الرابطة (كربون– أكسجين).
الشكل(38)يبيّن الإماهة الحمضية للفلافونيدات الجليكوزيدية في حالة O– جليكوزيل وC– جليكوزيل[60].

Gly-O
H^+
HO
\+ Glycoside
Flavone-O-glycoside
Flavone

Gly-O-Gly
H^+
Gly
\+ Glycoside
Flavone-C-glycoside

الشكل(38)يبين الإماهة الحمضية المركبات الجليكوزيدية

عمليا نقوم بمايلي :

في أنبوب إختبار نذيب المركب الجليكوزيدي في 1 مل من الميثانول، يضاف إليه 1 مل من حمض كلور الماء HCl (4N)ثم يسخن في حمام مائي عند 100م° لمدة 15 إلى 120 دقيقة .

بعد تبريد الأنبوب نقوم بإستخلاص من نوع سائل /سائلحيث نضيف2مل من الإيثرالإيثيلي(EtOET)يرج

جيدا ثم يترك الأنبوب للراحة ، حتى ظهور طورين طور عضوي وطور مائيتفصل الطبقة العضوية.

تكررالعملية مرتين ثم نقوم بنفس العملية مع خلات الإيثيل (AcOET) ثم البيوتانول العادي (n-butanol).

تركز الطبقة العضوية المحتوية على الأجليكون إذ يمكن التعرف على هذا الأخير بتسجيل

طيف(UV)وكذلك إجراء اختبارات كروماتوغرافية مع شواهد أجليكونية أما الجزء السكري فلتعرف عليه

نستعمل ألواح كروماتوغرافية (gel de silice 60 GF_{254}) حيث ترش($NaH_2PO_4$0.2M)تترك لتجف في

الهواء ثم توضع في فرن تحت درجة حرارة 100 م° لمدة ساعة . بعدها توضع بقعة من الطبقة المائية

مع بعض الشواهد السكرية المعروفة، يغمس اللوح الكروماتوغرافي في المملص(أستون / ماء :9 /1)

بعد هجرة البقع السكرية يستخرج اللوح الكروماتوغرافي ليجف في الهواء لمدة ساعة بعدها يرش بكاشف

مالونات الأنيلين و يسخن عند 100° لمدة 5 دقائق حيث تبدأ بقع السكريات بالظهور .

الفصل الثالث الدراسة الفيتوكيميائية لنبتة *Centaurea involucrata*

III.الدراسة الفيتوكيميائية للنبتة

III.1.الدراسة النباتية لـ *Centaurea involucrata*

III.1.1.الوصفالنباتي للنوع*C. involucrata*

نبتة زهرية ذو سيقان قائمة طولها حوالي40 سم، تتفرع منها أوراق صغيرة مدببة في نهاية الساق نجد زهرة صفراء متوسطة الحجم تحيط بها حراشف لها أشواك حادة.



صورة(1) صورة فوتوغرافية للنبتة

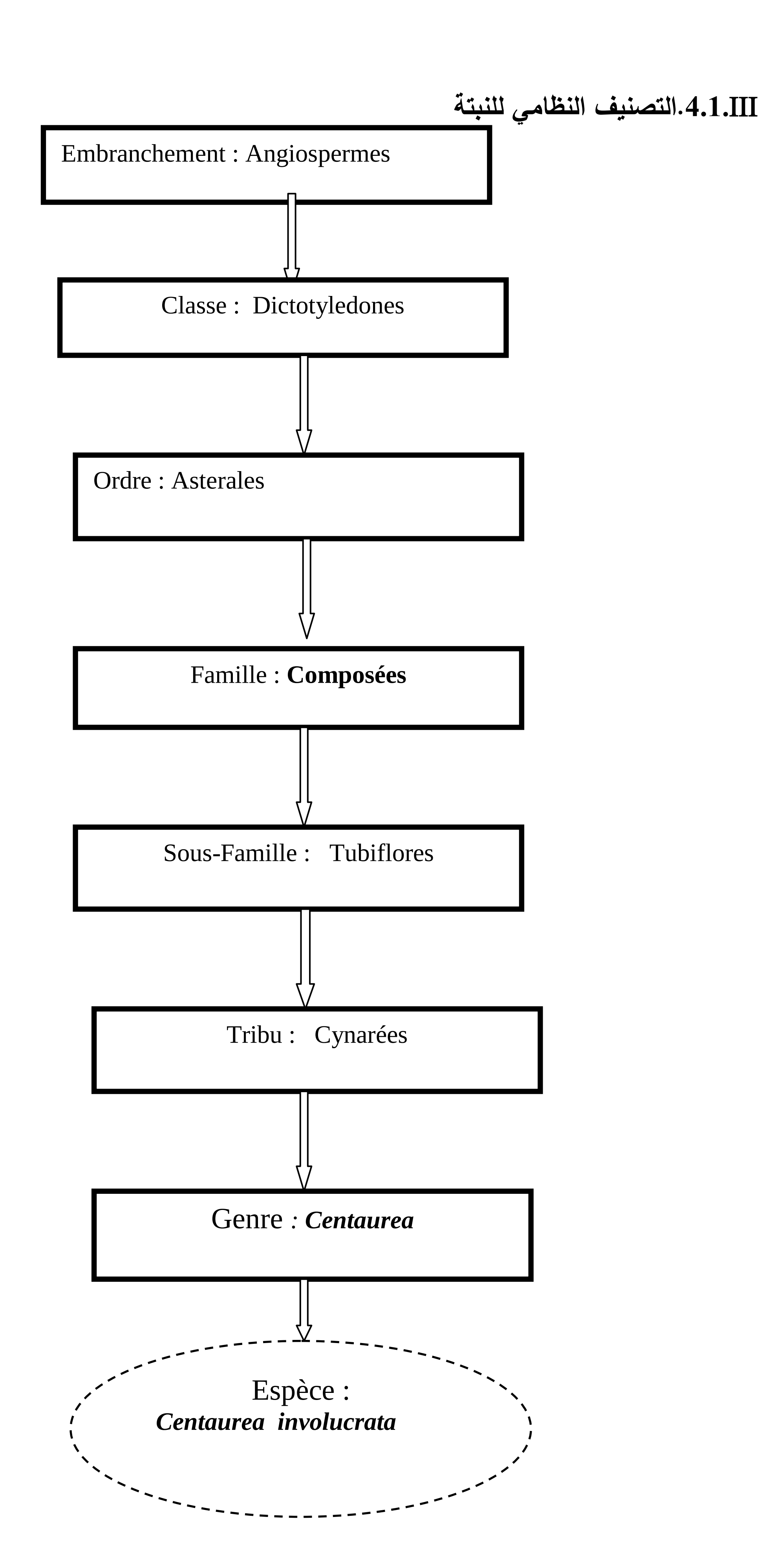
III.1.2.المادة النباتية :

جمعت هذه النبتة من ضواحي ولاية مسيلة من الشرق الجنوبي للجزائر تم تنقيتها من الجدور وتقطيعها، جففت بعيدا عن الشمس والرطوبة والغبار فكان وزن المادة النباتية المستعملة من الأوراق و الأزهار1626غ حيث تم استخلاصها معاللتشابه الكبير بين مستخلص الأوراق والزهور و ذالك بعد إجراء إختبارات أولية.

III.1.3.إختيارالمادة النباتية :

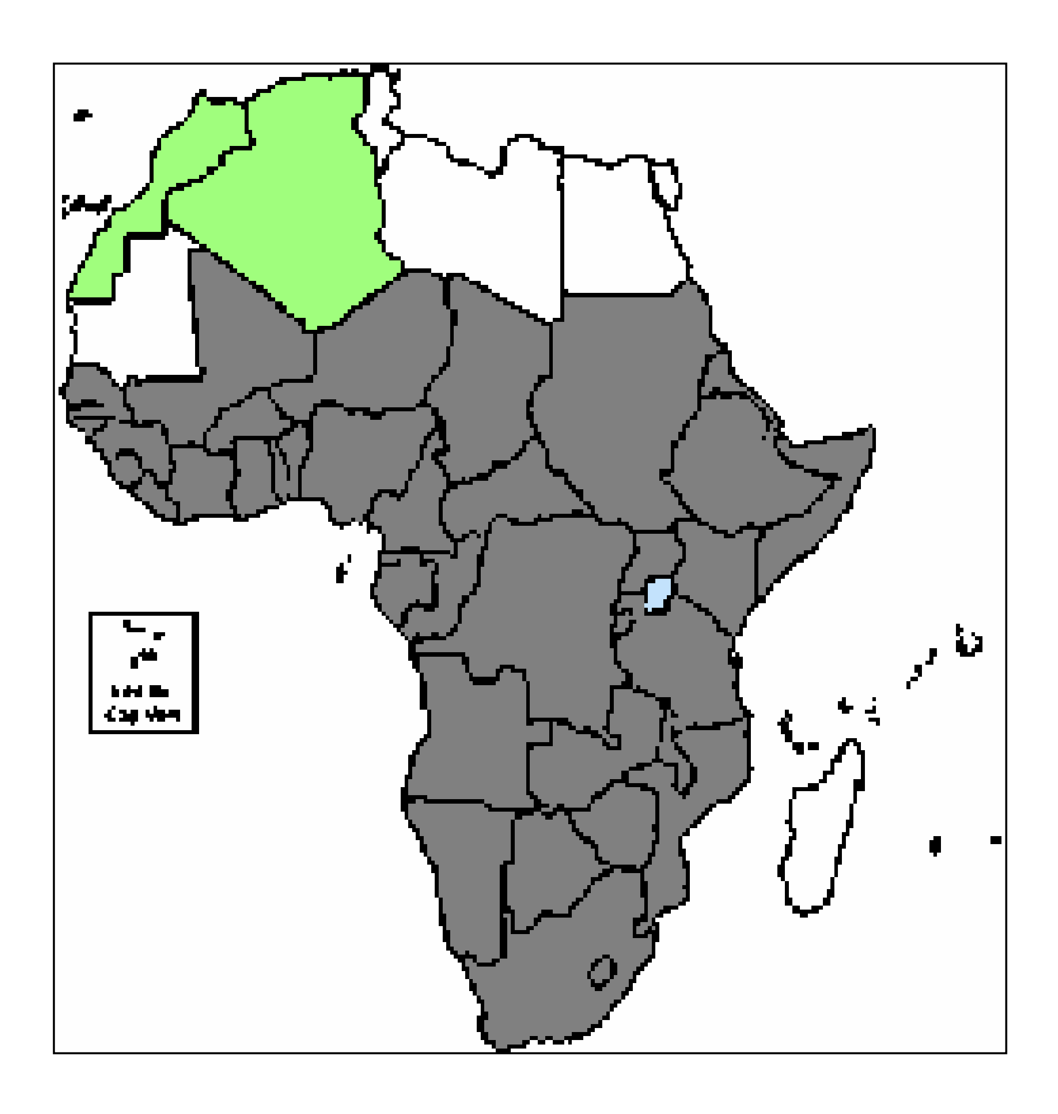
تم اختيار هذه النبتة على أ سس كيميائية و بيولوجية فجنس*Centaurea*يحتوي على الكثير من المركبات الفلافونيدية [61-62]و اللاكتونات السيسكوي تربينية أما بيولوجيا فقد أثبتت الأبحاث قدرة هذا الجنس على علاج الكثير من الأمراض و النوع الذي نحن بصدد دراسته هو *Centaurea involucrata* .

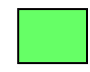
III.1.4.التصنيف النظامي للنبتة



III.1.5. التوزيع الجغرافي للنبتة ***Centaurea involucrata*** [63]

تنمو نبتة ***Centaurea involucrata*** بالنسبة للقارة الإفريقية في الجزائر، المغرب و الصحراء الغربية الشكل (39).





مكان تواجد نبتة ***Centaurea involucrata***

الشكل (39) التوزيع الجغرافي لنبتة *Centaurae involucrata*

III.2.التحليل الكيميائي

III.2.1. الاستخلاص:

نعتمد في عملية الإستخلاصاالإنتقائي (سائل– سائل)على مذيبات كإيثر البترول لنزع

الكلوروفيل والليبيدات و الكلوروفورم ($CHCl_3$) لاستخلاص الأجليكونات الحرة [28] .

وأكثر المذيبات استعمالا خلات الإثيل (AcOEt) لاستخلاص الأجليكونات عديدات الهيدروكسيل

والجليكوزيدات أحادية السكر كما يستعمل البيوتانول العادي (n-BuOH) في استخلاص الجليكوزيدات عديدة السكر.

عمليا:

تمت عملية الاستخلاص كما يلي جففت النبتة في مكان بعيد عن الغبار والشمس ثم قمنا بتنقيتها من الجذور وتقطيعها.

تنقع المادة النباتية في خليط من المثانول و الماء (2:8) وتترك لمدة24 سا .

ترشح ويركز المحلول تحت درجة حرارة 35° وضغط مناسب تكرر العملية 3مرات .

تنقع المادة النباتية المستعملة في مذيب جديد مثانول وماء (3:7) و في نفس الشروط تكررالعملية 3 مرات . يخفف الخليط بالماء المقطر ثم تبدأ عملية استخلاص سائل. سائل كمايلي :

في قمع الفصل نضيف إيثرالبترول للمستخلص، على أن يكون حجم المذيب (إيثر البترول) يساوي ثلث حجم المستخلص، يرج جيدا ثم يترك للراحة حتى يتشكل لنا طبقتين عضوية ومائية ، تفصل الطبقة العضوية و تركز تعاد العملية مرتين.

بعدها يجفف محلول إيثر البترول بكبريتات الصوديومNa_2SO_4 يرشح المحلول و يركز الراشح.

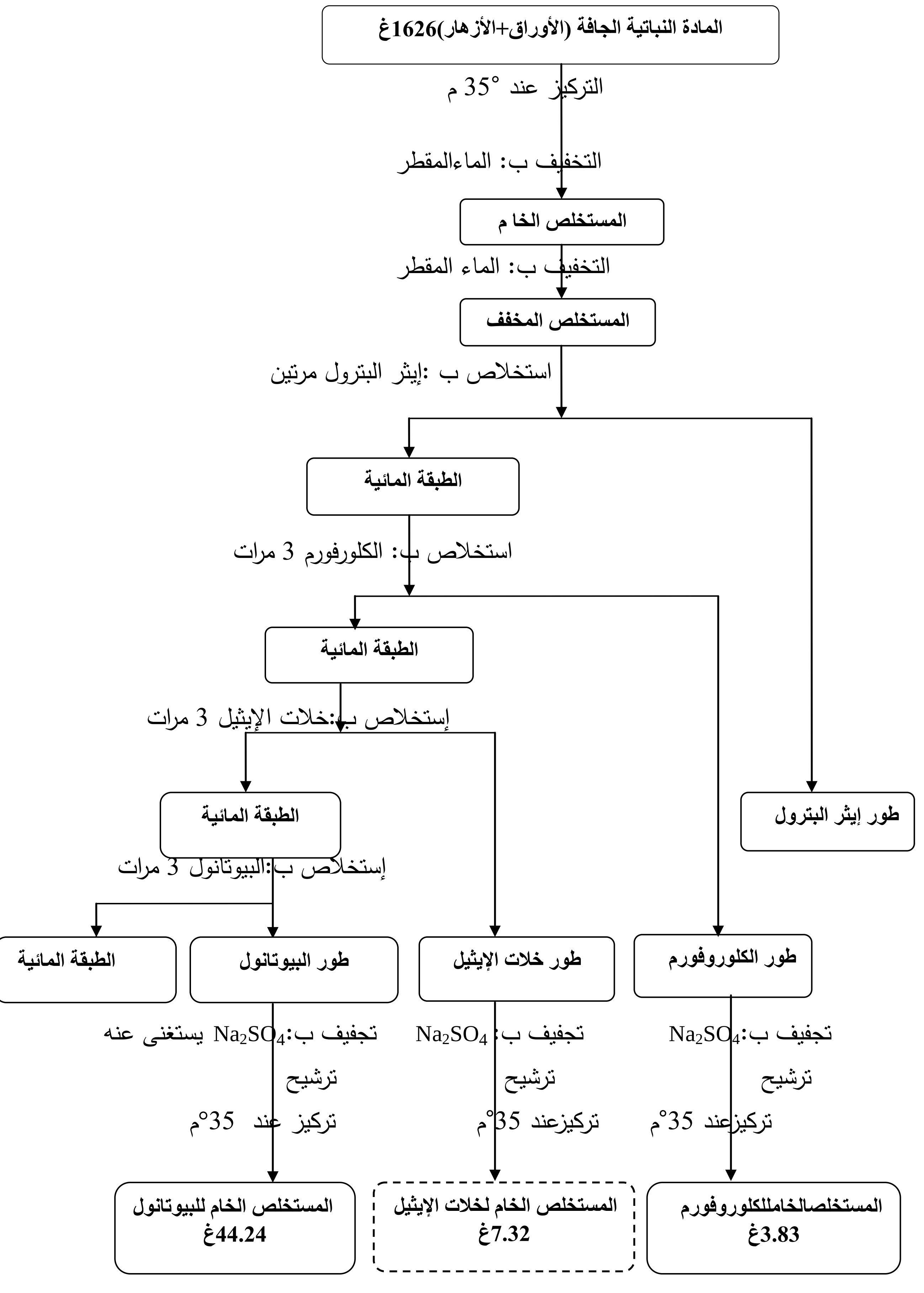
الطبقة المائية أعيد استخلاصها بمذيب الكلوروفورم تتبع نفس الطريقة السابقة(طريقة إيثر البترول)

على أن تعاد العملية 3 مرات بعدها يجفف محلول الكلوروفورم ،بكبريتات الصوديوم Na_2SO_4 يرشح المحلول و يركز الراشح.
الطبقة المائية أعيد استخلاصها بمذيب خلات الإيثيل ثم بالبيوتانول العاديحيث تتبع نفس الطريقة السابقة .

تمت عملية الفصل للمستخلص المخفف(7 :3) والمستخلص المخفف (8 :2) في قمع فصل مختلفين و بعد الحصول على مستخلصخلات الإيثيل من كل قمع أجريت إختبار على المستخلصين باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحليلية و الأشعة فوق بنفسجية (UV)حيث بينت تشابه في مكونات المستخلصين عندئذ جمعت في مستخلص واحد ثم وزن المستخلص فحصلنا على7.32غ وزن المستخلص الخام لخلات الإيثيل.

يمكن تلخيص أهم الخطوات المتبعة في عمليات الاستخلاص في الشكل (40) مع الوزن المحصل عليه في كل طور حيث حصلنا في الطور الكلوروفورم على 3.83غ أما طور البيوتانول تحصلنا على 44.24غ .

الشكل (40) الخطوات المتبعة في عملية استخلاص *Centaurea involucrata*



III.2.2.الفصل بواسطة كروماتوغرافيا العمود

قبل بداية عملية الاستخلاص أخذنا عينة من مستخلص خلات الإيثيل و أجرينا عليه اختبارات للأجل اختيار الملمص و الدعامة المناسبة، باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحليلية توصلنا إلى النظام الذي سمح بفصل جيد لمكونات المستخلص والتي ظهرت تحت الأشعة فوق البنفسجية (UV)على شكل بقع صفراء، زرقاء وسوداء بنفسجية الصورة (2).



الصورة (2)

تمثل كروماتوغرافيا االطبقة الرقيقة التحليلية لمستخلص خلات الإيثيل للأوراق و الأزهار في النظام ($CHCl_3$: Acètone /19 :1) بعد إستعمال الكاشف محلول حمض السيلفريك Solution acide sulfurique (H_2O : ACO_2H : H_2SO_4 /8 :1 : 1) وتسخين عند100مْ لمدة3 د.

- **تحضير المستخلص** :إذابة المستخلص الخام في قليل من الميثانول ثم إضافة كمية كافية من gel de silice تركه ليجف ثم يسحق .
- **كمية الدعامة** :غالبا يؤخد 30غ من gel de silice لكل 1غ من المستخلص الخام .

- **تحضير العمود:** إخترنا عمود مناسب طوله 95 سم و قطره 3.5سم أما الدعامة المستعملة فهي gel de silice 60, (230-400 mesh) ASTM merk

طول الدعامة 71سم والملمص المستعمل الكلوروفورم ثم الزيادة في القطبية باستعمال الأسيتون تدريجيا .



الصورة(3)العمود الكروماتوغرافي المستعمل في عملية الفصل

حصلنا على كسورجمعت المتشابهة تباعالكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحليلية بعد فحصها تحت الأشعة فوق البنفسجية(UV) فحصلنا على الجدول (16).

الكسور		الملمص	الوزن (مغ)	الملاحظة
1000مل	**F_0**	$CHCl_3$ 100%	20	شحوم
1−26	**F_1**	$CHCl_3$/Acètone 98-2	75	شحوم+كلوروفيل
27−40	**F_2**	$CHCl_3$/Acètone 98-2	140	مركب على شكل بلورات
41−95	**F_3**	$CHCl_3$/Acètone 98-2	1895	خليط قابل للفصل
96-120	**F_4**	$CHCl_3$/Acètone 19-1	90	خليط
121-197	**F_5**	$CHCl_3$/Acètone19-1	151	خليط قابل للفصل

خليط	99	$CHCl_3$/Acètone 7-1	F_6 198-211
خليط	103	$CHCl_3$/Acètone 5-1	F_7 212-242
خليط قابل للفصل	130	$CHCl_3$/Acètone 3-1	F_8 243-250
خليط	140	$CHCl_3$/Acètone 2-1	F_9 251-270
خليط قابل للفصل	53	$CHCl_3$/Acètone 2-1	F_{10} 271-304
مركب على شكل بلورات	1401	$CHCl_3$/Acètone 1-1	F_{11} 305-313
خليط	504	$CHCl_3$/Acètone 1-1	F_{12} 314-340
خليط معقد	501	$CHCl_3$/Acètone 1-2	F_{13} 341-375
خليط معقد	1140	$CHCl_3$/Acètone1-4	F_{14} 376-399
خليط معقد	307	Acètone 100%	F_{15} 1000مل
خليط معقد	410	Methanol100%	F_{16} 1000مل

الجدول(16)كروماتوغرافيا العمود لمستخلص خلا ت الإيثيل لـ .*Centaurea involucrata*

III.3.2.معالجة الكسور باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة

- **معالجة الكسرF2 (140مغ)**

المتحصل عليه من العمود الكروماتوغرافي عند النظام 98:2 / Acétone: $CHCl_3$
تم الحصول على المركب CIF_2 (140مغ) من العمود الكروماتوغرافي على شكل بلورات ، أختبرت نقاوة المركب بكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحليليةوباستعمال الأشعة فوق البنفسجية (UV)254نم،365نم.

- **معالجة الكسر F3 (1895 مغ)**

المتحصل عليه من العمود الكروماتوغرافيعند النظام 98:2/ Acétone:$CHCl_3$

استعملنا كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية المكررة مرتين باستعمال شرائح من السيليكاجل حيث تم فصل المركب CIF_3(37.6مغ) باستعمال المذيب /$CHCl_3$:3ml :2 gouttesMeOH
وباستعمال الأشعة فوق البنفسجية (UV)254نم،365نم.

- **معالجة الكسرF5 (151مغ)**

المتحصل عليه من العمود الكروماتوغرافي عند النظام 19:1/ Acétone:$CHCl_3$
استعملنا كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية المكررة مرتين و باستعمال شرائح من السيليكاجل
حيث تم فصل المركبCIF_5(88.4 مغ)باستعمال المذيب 1 : 15 / $CHCl_3$: MeOH
وباستعمال الأشعة فوق البنفسجية (UV)254نم،365نم.

- **معالجة الكسر F11(1401مغ)**

المتحصل عليه من العمود الكروماتوغرافي عند النظام 1:1Acétone: $CHCl_3$/
تم الحصول على المركبCIF_{11} (1401مغ) من العمود الكروماتوغرافي على شكل بلورات أختبرت نقاوة المركب بكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحليليةوباستعمال الأشعة فوق البنفسجية (UV)254نم،365نم.

IV .1. التعيين البنيوي للمركب CIF_2

تم التعرف على صيغة المركب **CIF_2** باستعمال طيف الرنين النووي المغناطيسي $RMN-^{1}H$ و $RMN-^{13}C$ باستعمال المذيب (CD_3COCD_3).

- **معطيات طيف الرنين النووي المغناطيسي $RMN-1H$, $RMN-^{13}C$**

من طيف $RMN-^{1}H$ طيف(2) نجد إشارات يمكن نسبها إلى حلقة عطرية و هي

- إشارة(ثنائي –ثنائي,J=7.66 ; 1.39Hz)عند δ_H =8.07ppm ذات التكامل 2H .
- إشارة(ثلاثية,J=7.66Hz) عند δ_H=7.67ppm ذات التكامل 1H.
- إشارة(ثلاثية ,J=7.66Hz)عند δ_H=7.55ppm ذات التكامل 2H .

هذه المعلومات تقودنا إلى أن الحلقة أحادية الاستبدال.

من طيف $RMN-^{13}C$ الطيف(3)

- إشارة عند δ_C=166.80 ppm يمكن نسبها إلى كربون حمض كربو كسيلي(ترافق).
- إشارات عند (δ_C=128.41 ;129.51 ;130.28 ;132.84ppm) تنسب إلى الحلقة العطرية .

نلخص هذه المعطيات الطيفية في الجدولين (17) و (18)

الجدول(17)معطيات طيف الرنين النووي المغناطيسي $RMN-^{1}H$(CD_3COCD_3, 250MHz)

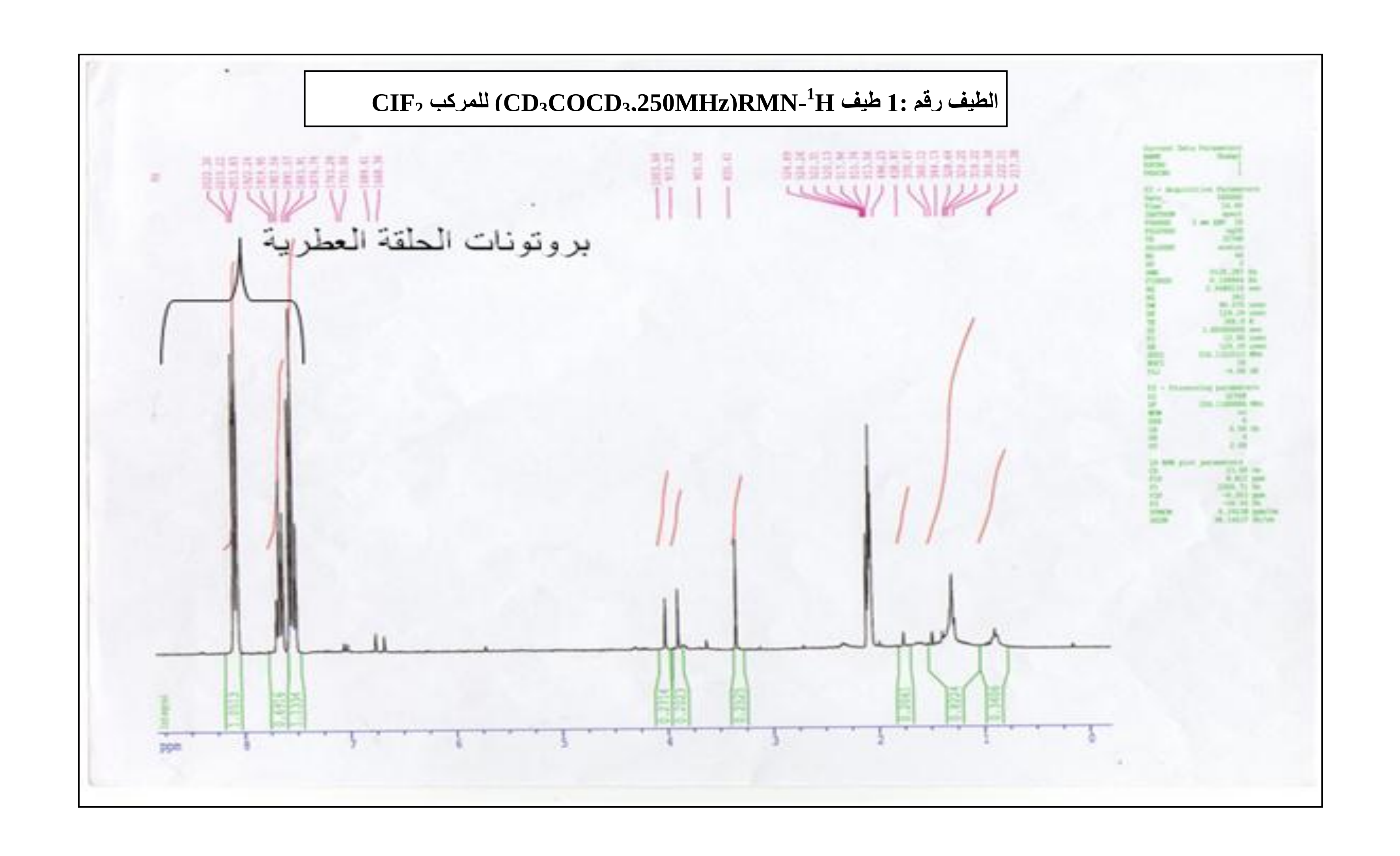
التعيينات الكيميائية	ثابت الإقتران J(Hz)	التكامل	التعددية	الإزاحة الكيميائية δ(ppm)
H-2+H-6	7.66 ;1.39	2H	dd	8.07
H-4	7.66	1H	t	7.67
H-3+H-5	7.66	2H	t	7.55

الجدول (18)معطيات طيف الرنين النووي المغناطيسي(RMN-^{13}C (CD_3COCD_3, 250MHz

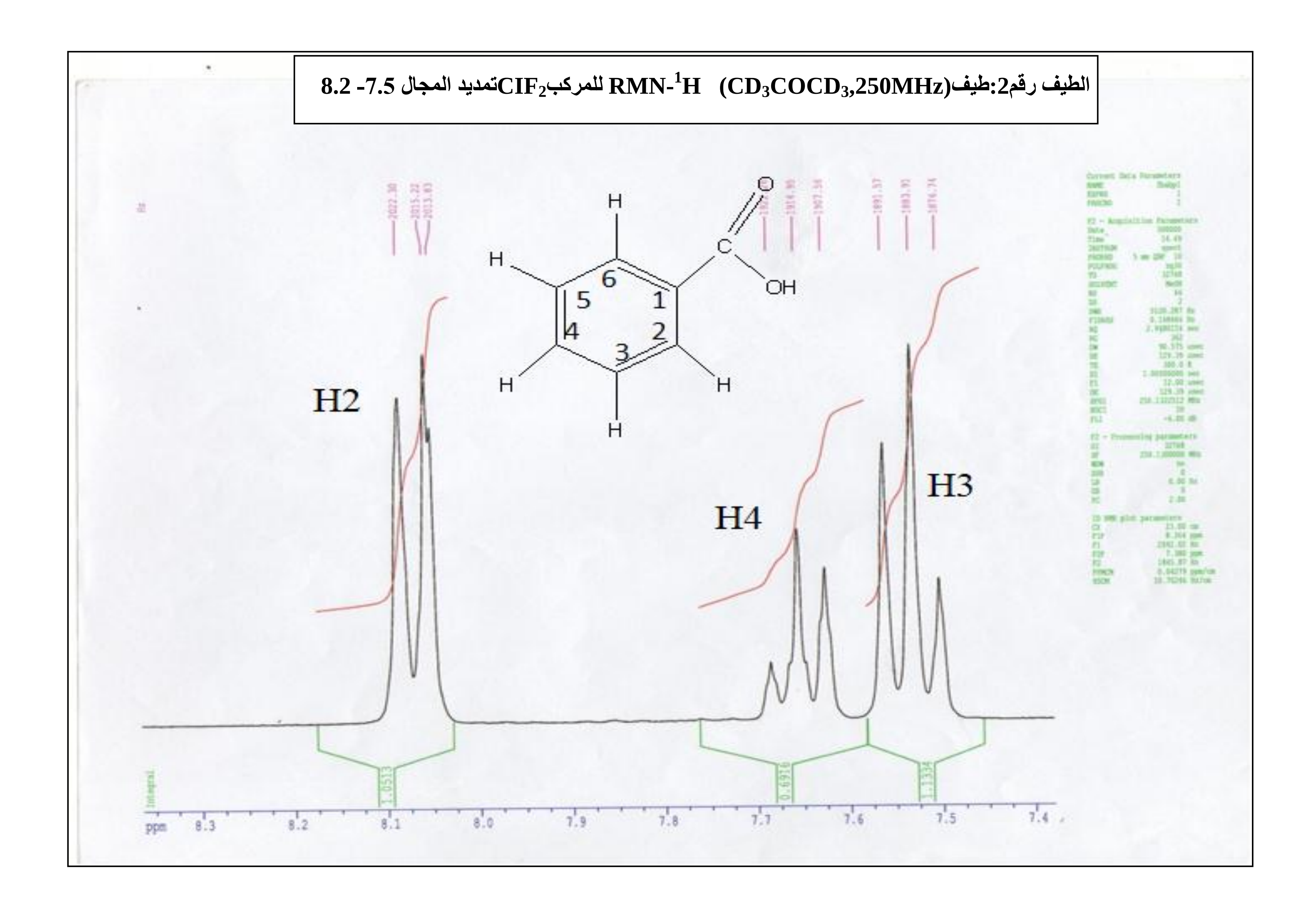
الإزاحة الكيميائية δ(ppm)	التعيينات الكيميائية
128.41	C-2+C-6
129.51	C-3+C-5
130.28	C-4
132.84	C-1
166.80	C

كل هذه النتائج تقودنا إلى الصيغة التالية للمركبCIF_2

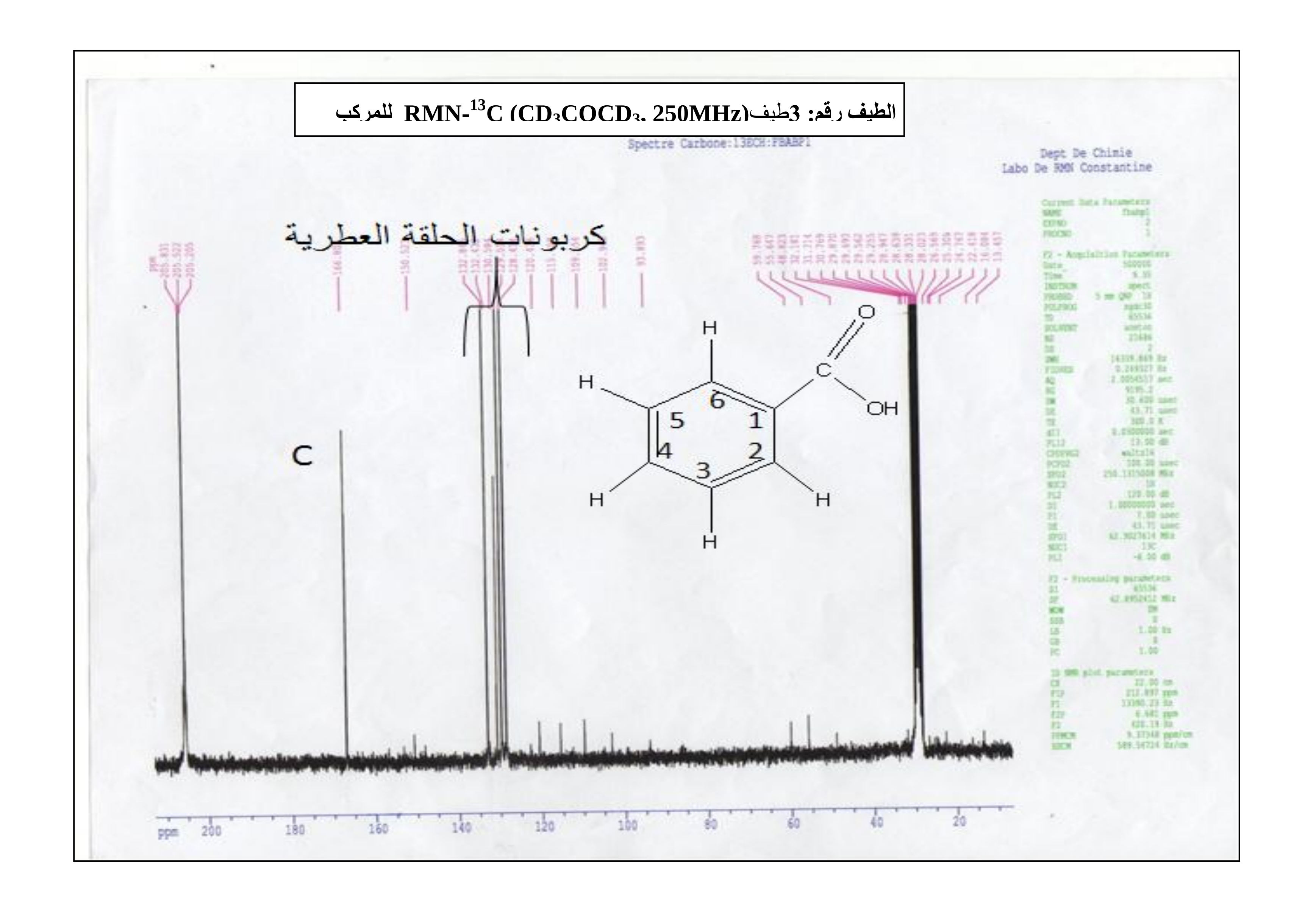
Acide benzoïque



الطيف رقم 1: طيف $RMN\text{-}^{1}H$ (CD_3COCD_3.250MHz) للمركب CIF_2



الطيف رقم2: طيف $(CD_3COCD_3, 250MHz)$ RMN-^{1}H للمركب ClF_2 تمديد المجال 7.5 - 8.2


الطيف رقم: 3 طيف RMN-13C (CD3COCD3، 250MHz) للمركب
Spectre Carbone:13ECH:FBABP1
Dept De Chimie
Labo De RMN Constantine
كربونات الحلقة العطرية
C
ppm

IV.2.التعيين البنيوي للمركب ClF_3

– الأنظمة المستعملة للتعرف على ثابت الإنحباس R_f

النظام I - 4 :3 :3 Toluène/MeCOEt/MeOH

النظام II - 13:3:3:1 H_2O/MeCOEt/EtOH/$(Ac)_2CH_2$

- **الخواص الكروماتوغرافية :**

النظام	I	II
ثابت الإحتباس	0.86	0.06
اللون الإستشعاعي	أسود بنفسجي	

الجدول(19) الخواص الكروماتوغرافية للمركبClF_3

- **السبل الطيفية**

1- معطيات مطيافية الأشعة فوق البنفسجية(UV)للمركبClF_3 مبينة في الجدول (20)

الكواشف	العصابة II (ن.م)	العصابةI (ن.م)	الملاحظة
MeOH	273	343	فلافون
NaOH	268	407	4'-OH
NaOH+5min	268	407	لم يتغير الطيف
$AlCl_3$	274	351	عدم وجودdi Ortho على الحلقة B
$AlCl_3$+HCl	274	358	5-OH
NaOAc	273	351	7-OR
NaOAc+H_3BO_3	271	351	وجود di Orthoعلى الحلقة A

الجدول(20)معطيات الأشعة فوق البنفسجية(UV)للمركبClF_3.

التحليـل :

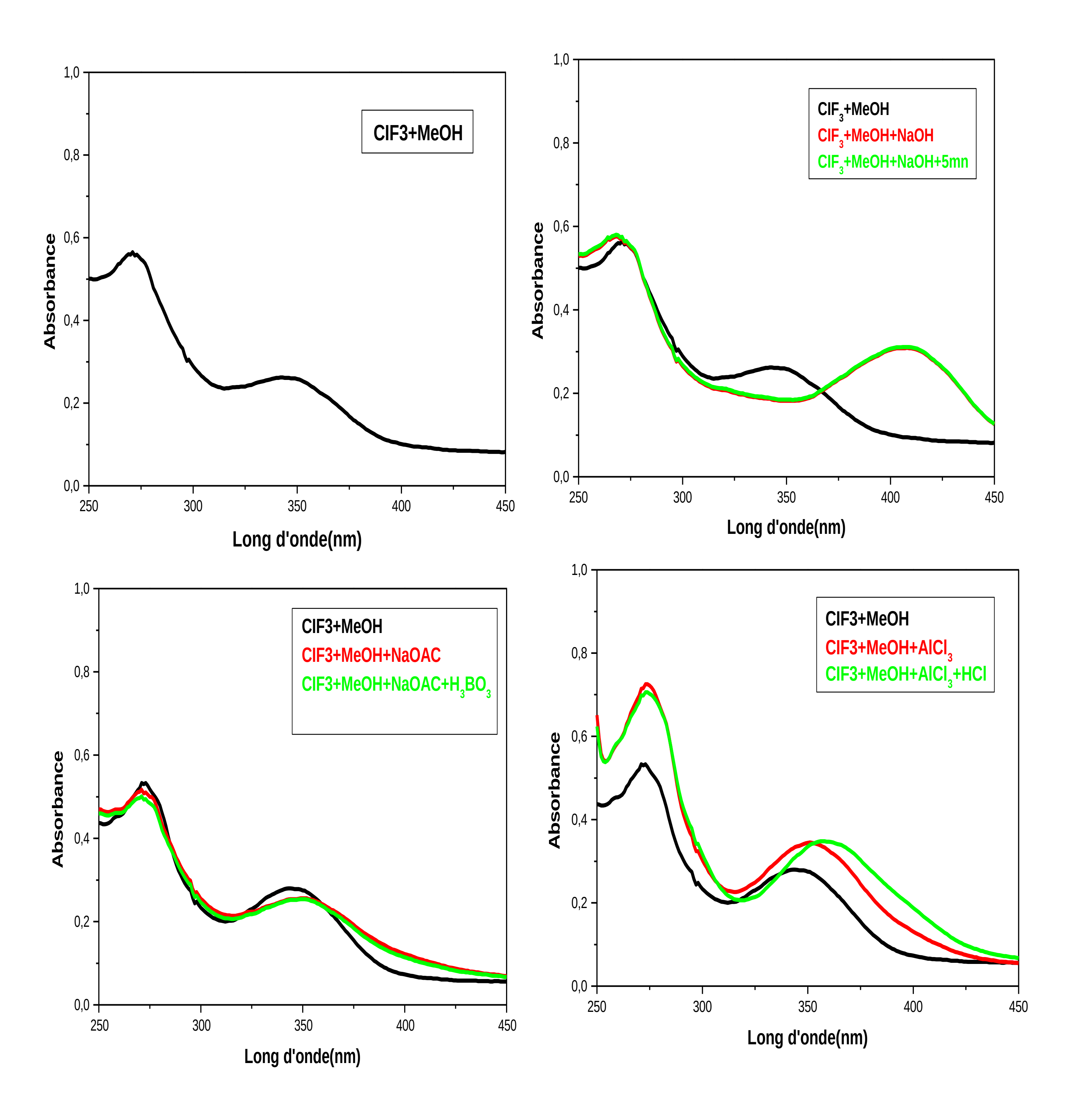
قيمة ثابت الإنحباس R_f يدل على أن المركب هوأجليكون .

- اللون الأسودالبنفسجي تحت الأشعة فوق البنفسجية (UV)و قيمة العصابة(I)في الميثانول عند 343نم تدل على أن المركب فلافون .
- بمقارنة الطيف المسجل في NaOHبالطيف المسجل في MeOH نجد إزاحة باتوكرومية للحزمة (I)بـ (+64نم) مع الزيادة في شدة الإمتصاص الضوئية ، تدل على وجود هيدروكسيل حر في الموضع ′4.
- غياب عصابة جديدة ما بين 320-335نم تدل على إستبدال الموضع 7 أي 7-OR.
- بمقارنة الطيف المسجل في NaOAc مع الطيف المسجل فيMeOH لانجدأي إزاحة للعصابة (II) وهذا يدل على وجود 7-OR .

– بمقارنة الطيف المسجل في ($NaOAc+H_3BO_3$) مع الطيفالمسجل فيMeOHنجد ازاحة باتوكرومية ضعيفة للحزمة (I) تدل على وجود أورثو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقة A.

– بمقارنة الطيف المسجل في($AlCl_3+HCl$) بالطيف المسجل في MeOH نجد ازاحة باتوكرومية للحزمة(I) بـ(+15نم) دلالة على وجود هيدروكسيل حر في الموضع 5.

- بمقارنة الطيف المسجل في $AlCl_3$ بالطيف المسجل في($AlCl_3+HCl$) لا نجد أي إزاحة هيبسوكرومية دلالة على غياب أورثو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقةB .



الطيف رقم(4) السلسلة الطيفية للأشعة فوق بنفسجية (UV) للمركب CIF_3

مجموعة هذه النتائج تقودنا إلى الصيغة الموضحة في الشكل(35)

الشكل (35)

2- معطيات طيف الرنين النووي المغناطيسي RMN-^{1}H للمركب CIF_3

- وجود إشارتين أحاديتين الأولى ذات التكامل 1H عند δ_H=6.6ppm والثانية ذات التكامل1H عند δ_H=6.75ppmيمكن نسبها إلى البروتونينH3وH8.

من نفس الطيف نجد إشارة ثنائية (*J*=8.17Hz) بتكامل1Hعندδ_H=7.1ppm يمكن نسبها إلى البروتون H5`.

- وجود إشارات متداخلة (ثنائي–ثنائي 2.03; *J*=8.17 ,Hzثنائي*J*=2.03Hz) بتكامل 2H عند (δ_H=7.63ppm ,δ_H=7.6ppm)وهي إزاحات خاصة ببروتونات الحلقة B يمكن نسبها إلى H2` ,H6` على الترتيب .
- وجود إشارة أحادية عندδ_H=3.76ppmبتكامل 3Hخاصة بمجموعة ميثوكسيل .
- وجود إشارة أحادية عندδ_H =4ppm بتكامل3H خاصة بمجموعة ميثوكسيل .

– كل هذه النتائج يمكن تلخيصها في الجدول(21)

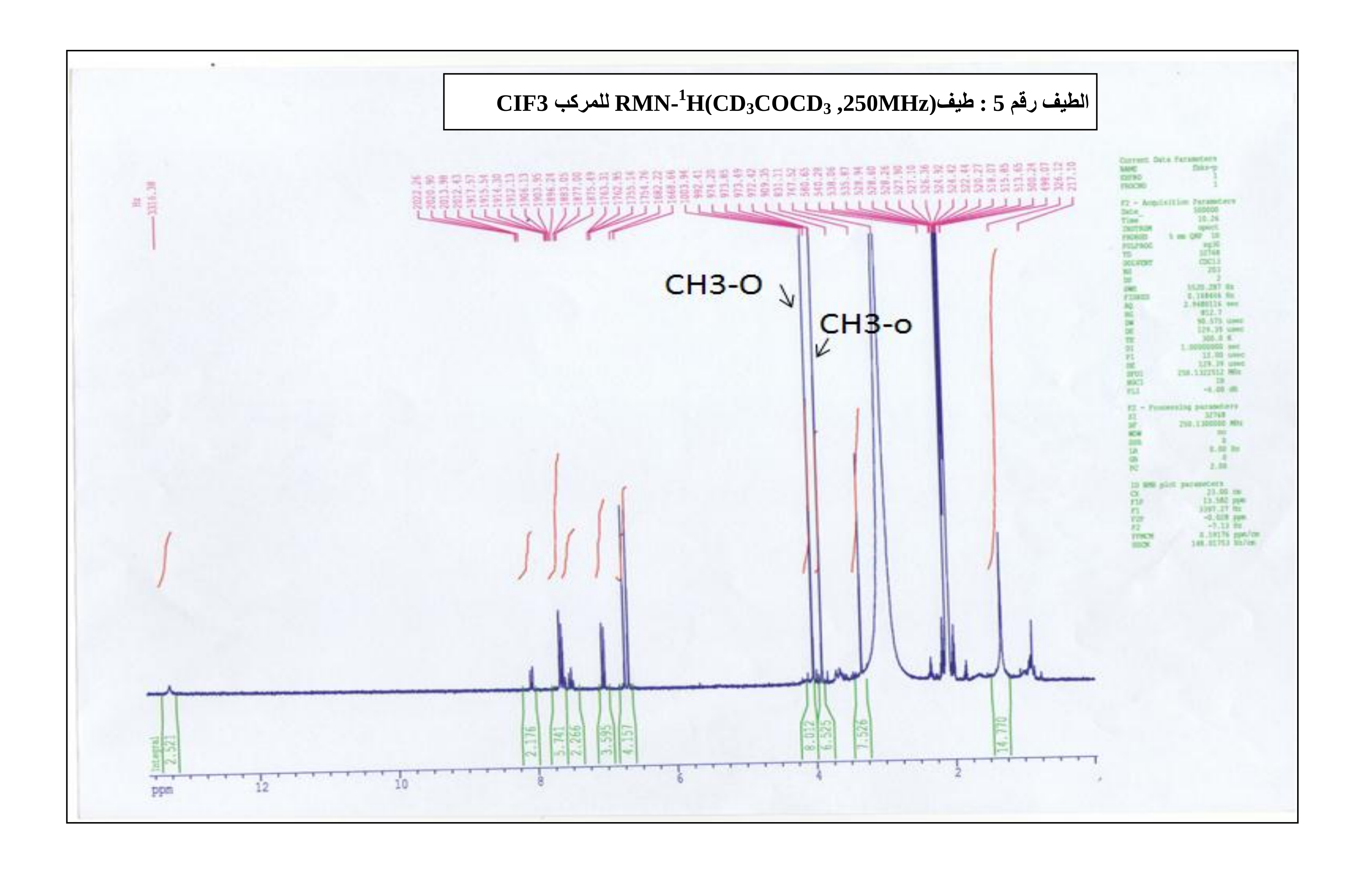
الإزاحة الكميائية δ(ppm)	التعددية	التكامل	ثابت الإقتران J(Hz)	التعيينات الكميائية
6.6 ; 6.75	s	1	---	H3
	s	1	---	H8
7.1	d	1	8.17	H5`
7.6	dd	1	8.17 ;2.03	H6`
7.63	d	1	2.03	H2`
3.76	---	3	---	O-CH3
4	---	3	---	O-CH3

الجدول(21)معطيات طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون RMN-^{1}H للمركب CIF_3

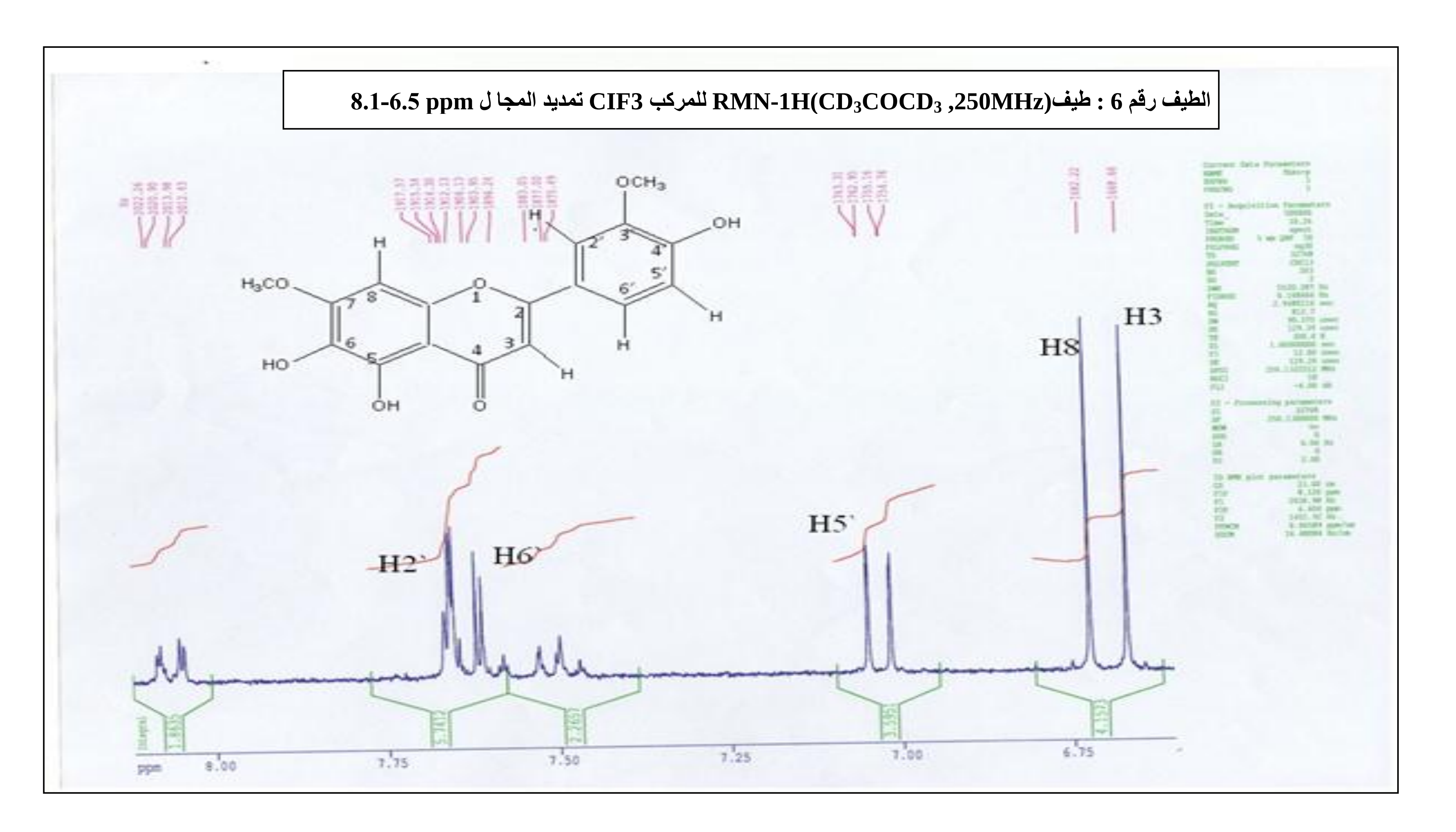
كل هذه المعطيات تقودنا إلى الصيغة التالية للمركب CIF_3

5,6,4`-trihydroxy-7,3` -dimethoxyflavone

الطيف رقم 5 : طيف RMN-^{1}H(CD_3COCD_3 ,250MHz) للمركب CIF3



الطيف رقم 6 : طيف RMN-1H(CD_3COCD_3 ,250MHz) للمركب CIF3 تمديد المجال 8.1-6.5 ppm



IV.3.التعيـين البنـيوي للمـركب ClF_5

- **الخواص الكروماتوغرافية :**

النظام	I	II
ثابت الإحتباس	0.75	0.03
اللون الإستشعاعي	أسود بنفسجي	

الجدول (22)

- **السبـل الطيــفيـة**

1 - مطيافية الأشعة فوق البنفسجية(UV) للمركبCIF5 مبينة في الجدول (23)

الكواشف	العصابة II (ن.م)	العصابةI (ن.م)	الملاحظة
MeOH	278	332	فلافون
NaOH	276	389	4'-OH عصابة جديدة عند 328نم يعني7-OH
NaOH+5min	276	389	لم يتغير الطيف
$AlCl_3$	284	349	لايوجد di Ortho
$AlCl_3$+HCl	284	350	5-OH مع 6-OR
NaOAc	275	331	7-OHمع 6-OR أو8-OR
NaOAc+H_3BO_3	276	331	لايوجد di Ortho

الجدول(23):مطيافية الأشعة فوق البنفسجية(UV)للمركبCIF5.

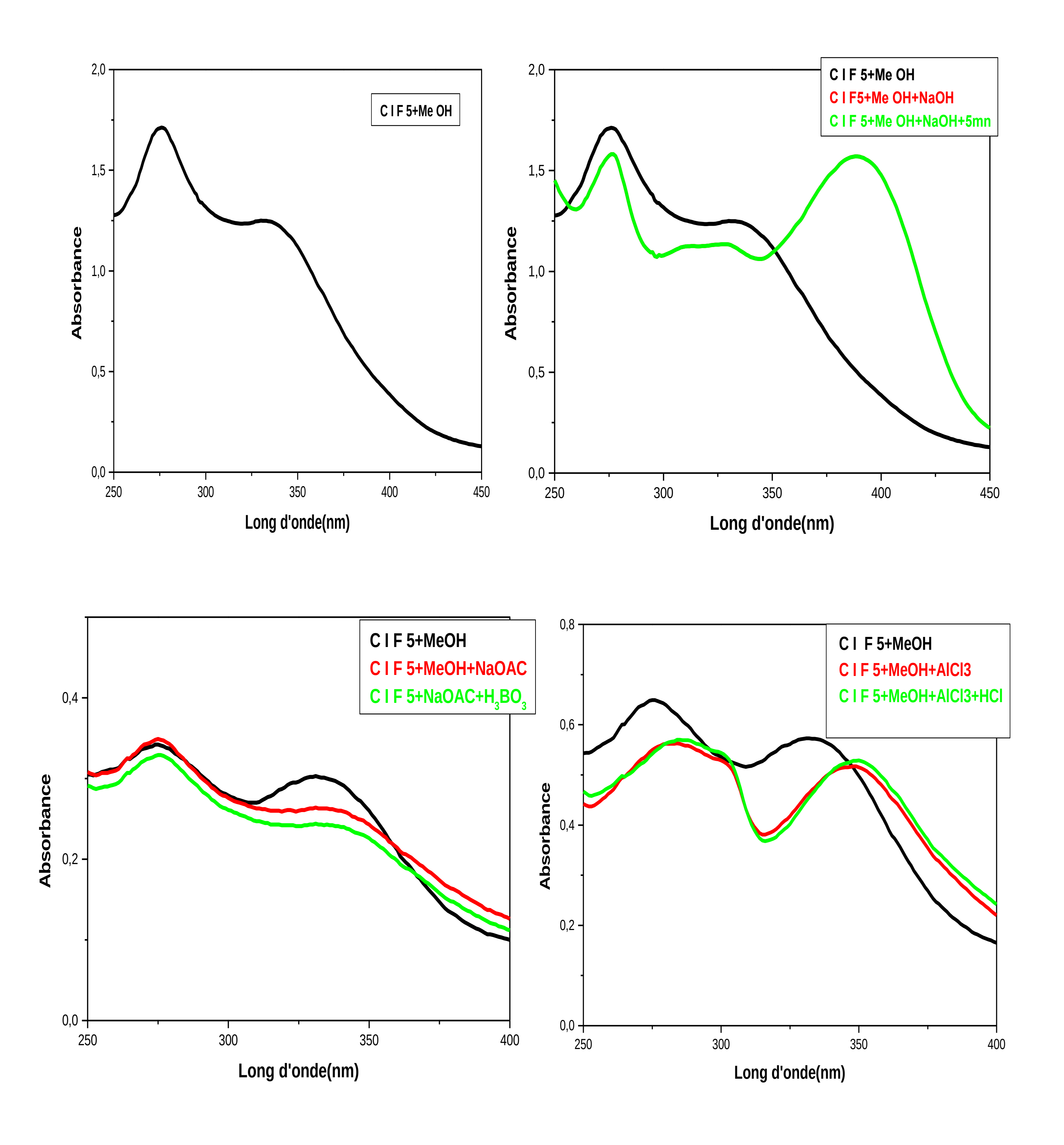
التحليل

- قيم ثابت الإنحباس تدل على أن المركب هو أجليكون .
- اللون الأسود البنفسجي تحت الأشعة فوق البنفسجية(UV) وقيمة العصابة (I) في الميثانول عند 332 نم دلالة على أن المركب فلافون .
- بمقارنة الطيف المسجل في NaOH مع الطيف المسجل في MeOHنجد إزاحة باتوكرومية (+57نم) للعصابة(I) مع ارتفاع في شدة الامتصاص ، دلالة على وجود هيدروكسيل حر في الموضع'4.
- ظهورعصابة جديدة عند 328نم دلالة على وجود هيدروكسيل حر في الموضع 7.
- بمقارنة الطيف المسجل في $AlCl_3$بالطيف المسجل في ($AlCl_3$+HCl)لا نجد أي إزاحة دلالة على عدم وجود أي أورثو ثنائي هيدروكسيل.
- بمقارنة الطيف المسجل في ($AlCl_3$+HCl)بالطيف المسجل في MeOH نجد إزاحة باتوكرومية للعصابة (I) بـ(+18نم) دلالة على وجود هيدروكسيل حر في الموضع 5 مع مجموعة أكسيجينية في 6 .
- بمقارنة الطيف المسجل في NaOAc مع الطيف المسجل في MeOH نجد إزاحة باتوكرومية للعصابة (II)بـ (+3نم) دلالة على وجود هيدروكسيل حر في الموضع 7 و هذا تأكيد للنتيجة المستخلصة سابقا (ظهور حزمة جديدة عند 328نم) مع مستبدل في 6 أو 8 .

من نتيجة مقارنة طيف(MeOH/$AlCl_3$+HCl)يمكن إستنتاج أن الإستبدال يكون في الموضع 6.

- بمقارنة الطيف المسجل في(NaOAc+H_3BO_3) مع الطيف المسجل في MeOHلانجد أي إزاحة تأكيدا على عدم وجود ثنائي هيدروكسيل على الحلقة Aو الحلقة B.

و هي نفس الملاحظة المأخودة من طيف المقارنة المسجل في ($AlCl_3$/$AlCl_3$+HCl).



الطيفرقم(7)السلسلة الطيفية للأشعة فوق بنفسجية (UV) للمركب CIF_5

مجموعة هذه المعلومات تقودنا إلى الصيغة التالية:

الشكل (36)

2-معطيات طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون RMN-^{1}H للمركب CIF_5

– وجود إشارة ثنائية(J=8.94Hz) بتكامل 1H عند (δ=7.76ppm) يمكن نسبها إلى `H6.

– وجود إشارة أحادية بتكامل 1Hعند (δ=7.52ppm) يمكن نسبها إلى `H2.

– وجود إشارة ثنائية (J=8 .89ppm) بتكامل1H عند(δ=6.9ppm)يمكن نسبها إلى `H5.

– وجود إشارة أحادية بتكامل 1Hعند (δ=6.49ppm)يمكن نسبها إلى H8.

– وجود إشارة أحادية بتكامل 1H عند(δ=6.26ppm) يمكن نسبها إلى H3بماأن المركب فلافون .

– إشارة أحادية عند (δ=3 .77ppm) بتكامل 3Hخاصة بمجموعة ميثوكسيل .

– وجود إشارة أحادية عند (δ=3 .65ppm) بتكامل 3Hخاصة بمجموعة ميثوكسيل .

كل هذه النتائج يمكن تلخيصها في الجدول (24)

الإزاحة الكميائية δ(ppm)	التعددية	التكامل	ثابت الإقتران J(Hz)	التعيينات الكميائية
6 .26	s	1	---	H3
6.49	s	1	---	H8
6.9	d	1	8.9	H5`
7.52	sl	1	---	H2`
7.76	dl	1	8.9	H6`
3.65	s	3	---	O-CH3
3.77	s	3	---	O-CH3

الجدول(24) معطيات طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون $RMN-^{1}H$ للمركب CIF_5

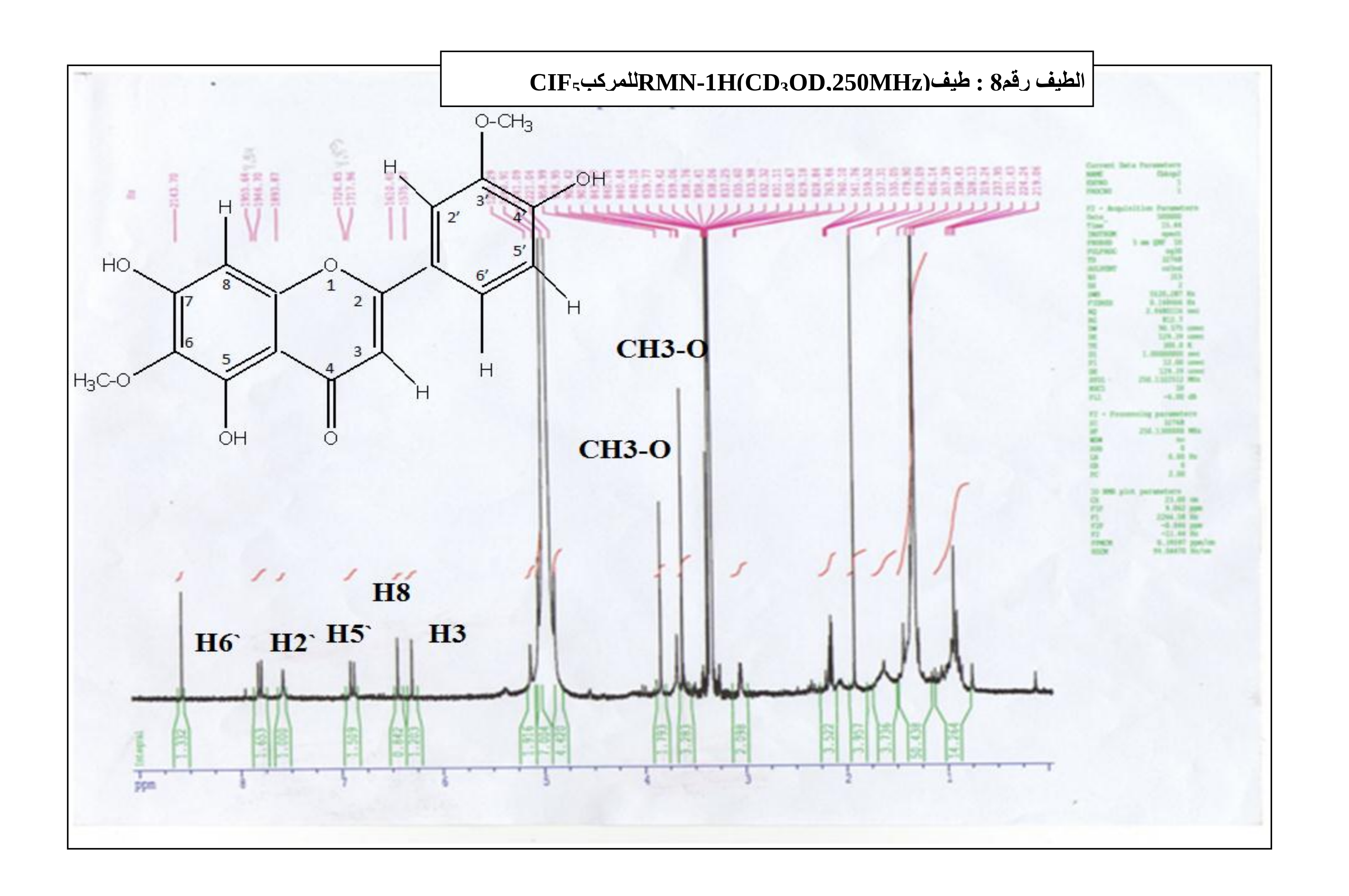
مجموعة هذه المعطيات تقودنا إلى الصيغة التالية للمركب CIF_5:

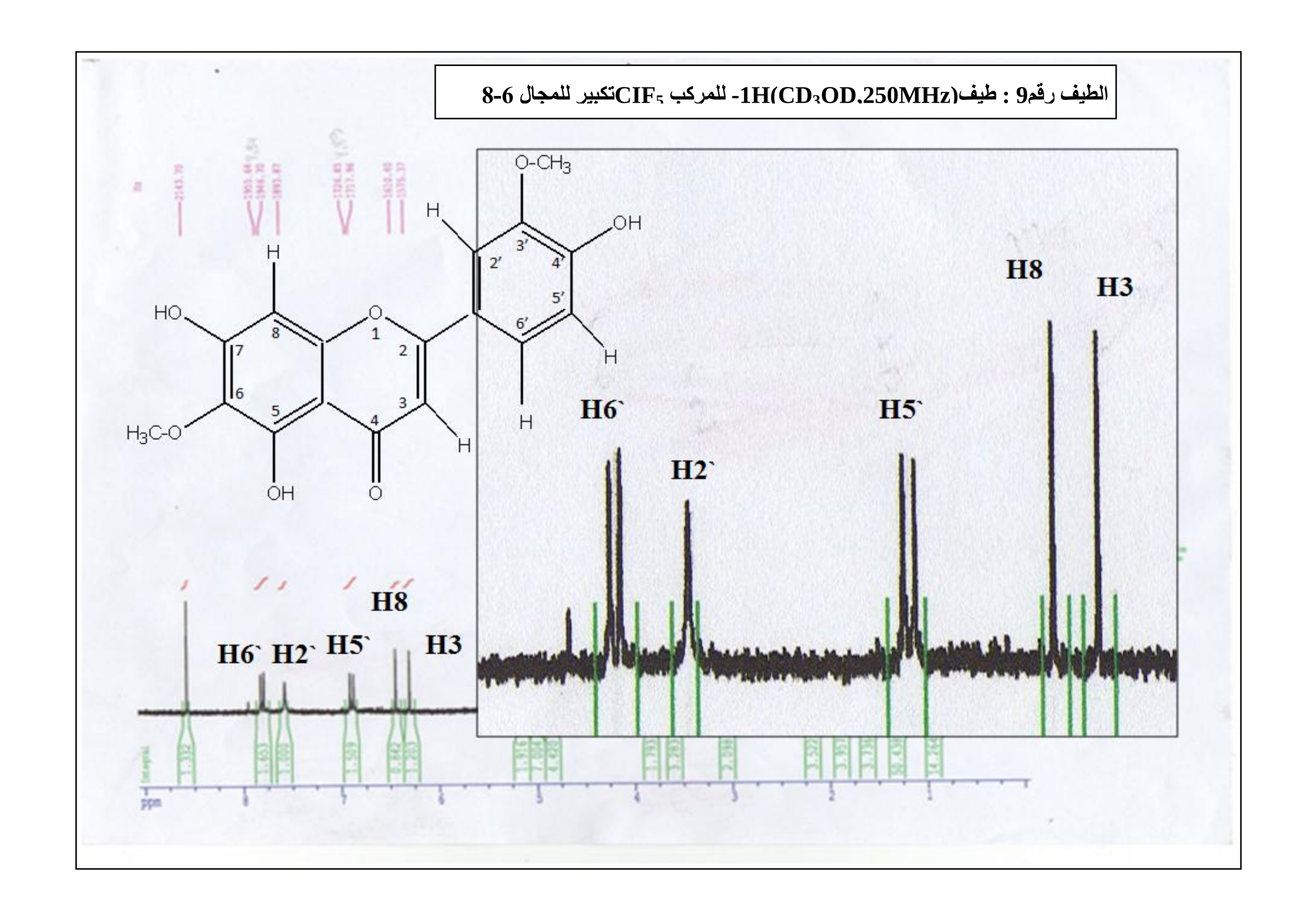
5,7,4`-trihydroxy 6,3`dimethoxyflavone

- ❖ حسب معلوماتنا البيبليوغرافية هذا المركب جديد بالنسبة للنوع *C.involucrata* أما بالنسبة للجنس *Centaurea* فقد سبق فصله من

.[21]*Centaurea maroccana*,[64]*Centaurea nicaensis.All*

الطيف رقم8 : طيف RMN-1H(CD_3OD.250MHz) للمركب CIF_5





الطيف رقم9 : طيف $^{1}H(CD_3OD.250MHz)$- للمركب CIF_5 تكبير للمجال 6-8

4.IV.التعيين البنيوي المركب CIF_{11}

1.4. IV. السلوك الكروماتوغرافي

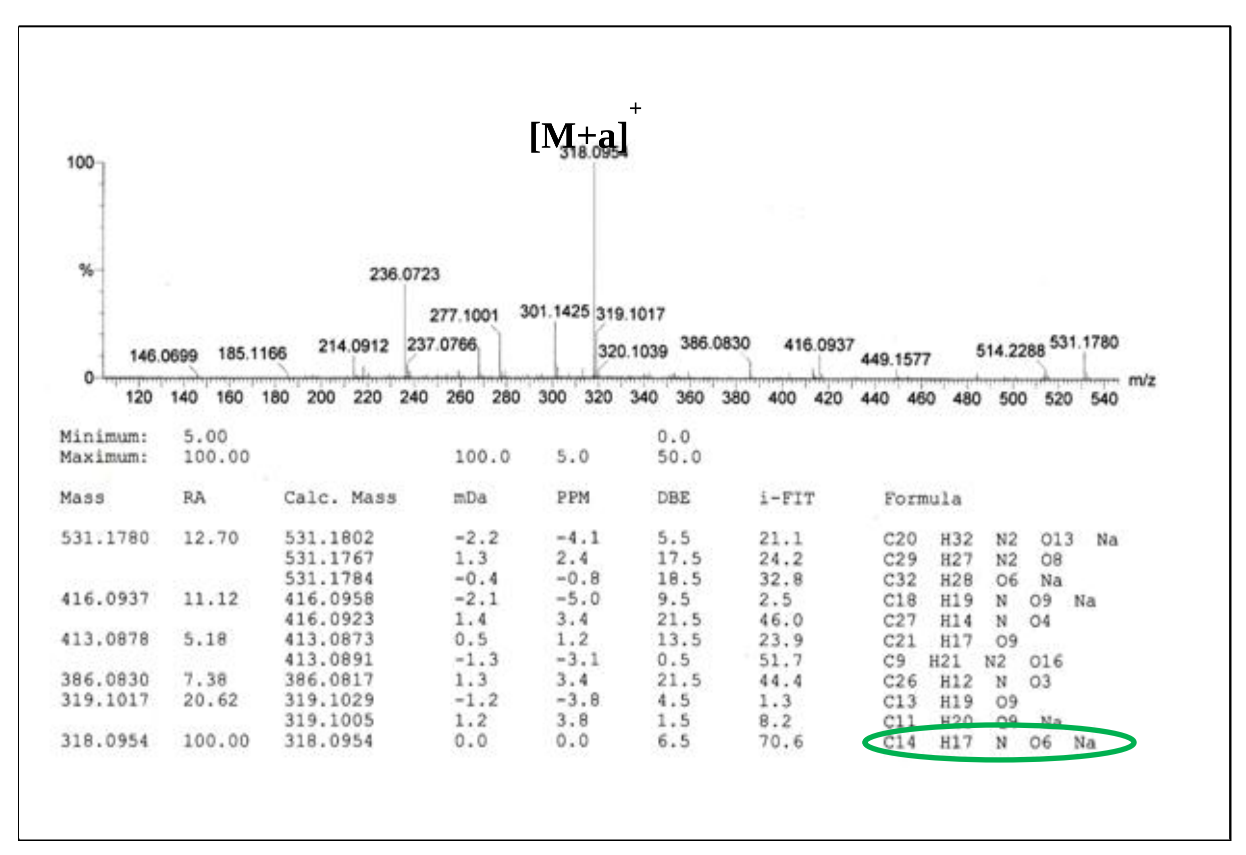
لون المركب تحت الأشعة فوق البنفسجية(UV)أسود.

2.4. IV. المعطيات الطيفية

لتشخيص المركب CIF_{11} إعتمدنا على طيف الرنين النووي المغناطيسي -RMN ,^{13}C -RMN ^{1}H، DEPT135, DEPT90 ,HSQC, COSY (H1,H1) بإ ستعمال المذيب (CD_3COCD_3) مع طيف الكتلةESI .

1.2.4.IV.معطيات طيف الكتلة ESI

في طيف الكتلةESI(الطيف10) نجد أيون شبه جزئي$[M+Na]^+$ عند m/z =318.0954 يعني أن الكتلة المولية الجزئية للمركب هي M=295 Daوصيغته الجزئية المجملة هي $C_{14}H_{17}NO_6$ عدد الوحدات الغير مشبعة سبعة (7).



Minimum:	5.00				0.0		
Maximum:	100.00		100.0	5.0	50.0		

Mass	RA	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Formula
531.1780	12.70	531.1802	-2.2	-4.1	5.5	21.1	C20 H32 N2 O13 Na
		531.1767	1.3	2.4	17.5	24.2	C29 H27 N2 O8
		531.1784	-0.4	-0.8	18.5	32.8	C32 H28 O6 Na
416.0937	11.12	416.0958	-2.1	-5.0	9.5	2.5	C18 H19 N O9 Na
		416.0923	1.4	3.4	21.5	46.0	C27 H14 N O4
413.0878	5.18	413.0873	0.5	1.2	13.5	23.9	C21 H17 O9
		413.0891	-1.3	-3.1	0.5	51.7	C9 H21 N2 O16
386.0830	7.38	386.0817	1.3	3.4	21.5	44.4	C26 H12 N O3
319.1017	20.62	319.1029	-1.2	-3.8	4.5	1.3	C13 H19 O9
		319.1005	1.2	3.8	1.5	8.2	C11 H20 O9 Na
318.0954	100.00	318.0954	0.0	0.0	6.5	70.6	C14 H17 N O6 Na

الطيف رقم 10 : طيفESIMSللمركبCIF_{11}

IV.2.2.4. معطيات طيف الرنين النووي المغناطيسي RMN

- من طيف $RMN-^{13}C$ (الطيف12)نجد 12 ذرة كاربون فقط مما يعني وجود كربونات عطرية متكافئة .

يمكن التعرف على نوع الذرات من خلال طيفDEPT90(الطيف12) و طيف DEPT135(الطيف11) فنصل إلى النتيجة التالية : (2) Cq ; (6) CH-O ; (3) CH= ; (1)CH_2-O.

- في طيف $RMN-^1H$ (الطيف 16)نجد إشارتين مميزتين لحلقة عطرية الأولى ذات التكامل 2H (δ_H=7.63ppm، J_H=6.53 ; 1.95Hz) .

والثانية ذات التكامل 3H(δ_H=7.5 . J_H= 4.99 ; 2 ppm)هذا يعني أن الحلقة أحادية الإستبدال .

- من طيف $RMN-^{13}C$ (الطيف13)المسجل في(CD_3COCD_3)نجد مجموعة إشارات CH= عند (δ_C=(128.92 ;130.30 ;131.01 ، Cqعندδ_C=135.23ppm وهي إزاحات خاصة بالحلقة العطرية.
- من طيفHSQC(الطيف 18) يمكن نسب كل بروتون الحلقة العطرية إلى الكربون الموافق له فيكون لدينا :

(δ_C=128.92ppm - δ_H=7.63ppm)
(δ_C=131.01ppm - δ_H=7.5ppm),(δ_C=130.30ppm -δ_H=7.5ppm)

- من طيف $RMN-^{13}C$ (الطيف 14) نجد مجموعة إزاحات يمكن نسبها إلى وحدة سكر خاصة بوجود إزاحة عند δ_C=63.43ppmلمجموعة CH2-O.
- من طيف HSQC(الطيف 18)يمكننا التعرف على إشارات بروتونات المجموعةCH_2-O فنجد H-6`b ($\delta_H$=3.72ppm) ; H-6`a (δ_H=3.93ppm) .

في طيف $RMN-^1H$(الطيف17)نجد الإشارتين من النوع(ثنائي- ثنائي)الأولى الخاصة بـ H-6`a (δ_H=3.93ppm.J_H=11.70 ;1.82Hz)

والثانية الخاصة بـH-6`b(δ_H=3.72ppm. J_H=11.70 ;5.4 Hz)
- في طيف $RMN-^1H$(الطيف 17)وجود إشارة ثنائية عند (δ_H=4.45ppm . J_H=7.02Hz) تلحق بالبروتون الأنوميري .

- بالنظر إلى قيمة الإنزياح الكيميائي للبروتون الأنوميري ($\delta_{H-1'}$=4.45ppm)تدل على أن وحدة السكرتتصل مع ألجليكون برابطة من النوع(C-O) كربون− أكسجين . وهذا تؤكده الإزاحة الكيميائية للكربون الأنوميري من طيف HSQC(الطيف18) نجد إزاحته عند $\delta_{C-1'}$=102.69ppm.

ثابت التزاوج للبروتون الأنوميري)$J_{H-1'}$=7.02Hz) يدل على أن التوجيه `H-2 محوري مما يقودنا إلى إفتراض أن المستبدل السكري عبارة عن جليكوزأوجلاكتوزمن النوع (β-galactoseأوβ-glucose)

- تظهر فيطيفRMN-^{1}H الطيف(15) باقي بروتونات السكر في المجال-(δ_H=3.51ppm)(δ_H=3.26ppm) يمكن نسبها إلى `H-2; `H-3; `H-4; `H-5.
- من المعطيات السابقة وصلنا إلى النتيجة التالية:

(C6H5) عدد ذرات الحلقة العطرية أحادية الإستبدال

R

(C6H11O6) عدد ذرات المستبدل السكري (جليكوز أوجلاكتوز)

R-O-glu

(عدد الذرات الباقية من الصيغة الإجمالية للمركب هي (C2HON)وعدد الوحدات الغير مشبعة 2)

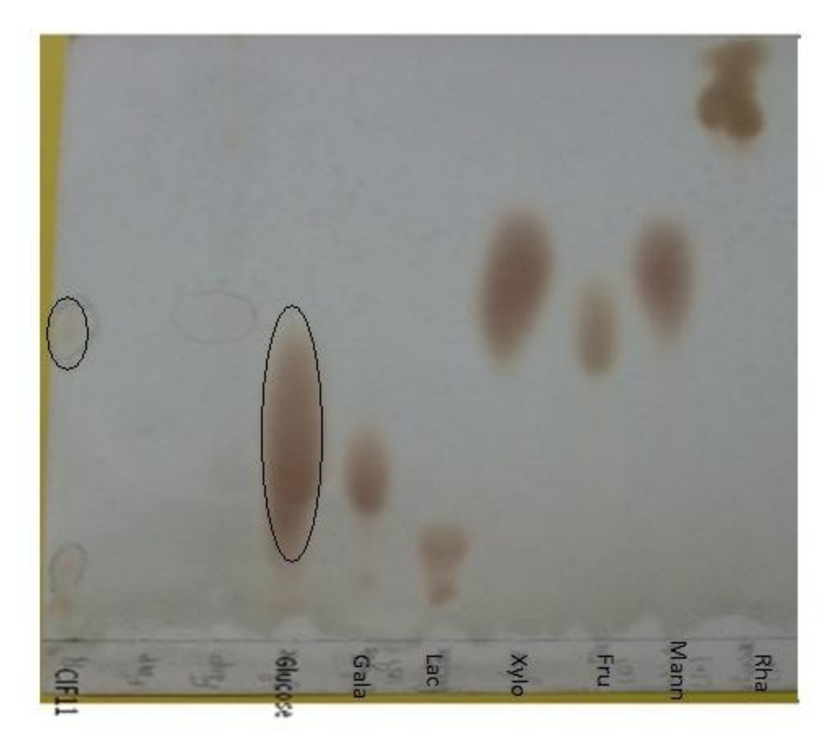
- من طيف HSQC(الطيف 18) نجد إزاحة كربون لمجموعة CH-Oعندδ_C= 68,60 ppm تقابلها إشارة أحادية للبروتون عندδ_H=6ppm
- نعود إلى طيف ^{13}CRMN- نجد إشارة لكربون رباعي Cqعند (δ_C=119,80ppm)تتسب إلىكربون المجموعة CN(Nitrile).
- من المعطيات السابقة وصلنا إلى الصيغة الموضحة في الشكل (37)

glu
O
H
C
H
H
C
N
H
H
H

الشكل (37)

IV.3.4.الإماهة الحمضية للمركب CIF_{11}

للتعرف على نوع السكربالضبط قمنا بالإماهة الحمضية للمركب حيث أخذنا قليل من المركب مذاب في 1مل من الميثانول أضفنا إليه 2مل من HCl(4N) وضع في حمام مائي درجة حرارته 100م°لمدة ساعة ونصف ، ترك ليبرد ثم تم إستخلاصه بخلات الإيثيل ثلاث مراتتؤخد الطبقة المائية تضع على شكل بقع مع الشواهد السكرية على شريحة كروماتوغرافية، تغمس في المذيب أسيتون /ماء(1/9).بعد جفافها ترش بمحلول مالونات الأنيلين تم سخنت فأعطت النتيجة الموضحة في الصورة(5) نوع سكر المركبCIF_{11} هو **الجليكوز.**



الصورة (5) كروماتوغرافيا السكر المفصول من المركبCIF_{11}مقارنة مع شواهد سكرية معروفة.

- من طيفHSQC(الطيف18) نجد إزاحات كربونات الجليكوزالباقية عند (δ_C=71,92 ;75,99 ;78,26 ;78,31ppm)بالإعتماد على المرجع البيبليوغرافي[65] يمكن معرفة تموضع هذه الإزاحات.

يمكن تلخيص كل هذه المعطيات في الجداولين (25) و(26).

الجدول (25)معطيات طيف($RMN-^{13}C(CD_3COCD_3$,500MHz)للمركب CIF_{11}

الإزاحة الكميائيةδ_C(ppm)	كربون الحلقة العطرية
135.23	C-1
128.92	C-2 ;C-6
130.30	C-3 ;C-5
131.01	C-4
لإزاحة الكميائيةδ_C(ppm)	كربون السكر
102.69	C-1`
75.99	C-2`
78.26	C-3`
71.92	C-4`
78.31	C-5`
63.43	C-6`
لإزاحة الكميائيةδ_C(ppm)	كربون السلسلة
68.60	CH-O
119.80	CN

الجدول(26) معطيات طيف ($RMN-{}^{1}H(CD_3COCD_3$,250MHz)للمركب CIF_{11}

الإزاحة الكميائية (ppm)	ثابت التزاوج(J(Hz	التعددية	التكامل	بروتونات الحلقة العطرية
7.5	4.99 ;2	dd	3H	H-3 ; H-5 ; H-4
7.63	6.53 ;1.95	dd	2H	H-2 ; H-6
الإزاحة الكميائية (ppm)	ثابت التزاوج(Hz)	التعددية	التكامل	بروتونات السكر
4.45	7.02	d	1H	H-1`
3.93	11.70 ;1.82	dd	1H	H-6`a
3.72	11.70 ;5.49	dd	1H	H-6`b
3.26 - 3.51	-----	m	3	H-2` ;H-3` ;H-4` ;H-5`
الإزاحة الكميائية (ppm)	ثابت التزاوج(Hz)	التعددية	التكامل	بروتونات السلسلة
6	_____	s	1H	H

- نستعمل طيف(COSY(H1, H1(الطيف 19)للتأكد من الصيغة النهائية للمركب.

بالنسبة لبروتونات الحلقة العطرية نجدبقعة التعالقبين بروتون (H-2 ; H-6) و بروتونات المجموعة (-H-3;H-5 ; H-4).

بالنسبة لبروتونات وحدة السكر(Glucose) نجد في طيفCOSY (H1,H1)بقعة التعالق بينالبروتون -H-1`والبروتون `H-2الموجودة إشارته في الطيف مع مجموعة إشارات بروتونات (H-3` ,H-4` ,H-5`).

نجد أيضا بقعة التعالق بين البروتون H-6`a والبروتونH-6`b.

وجود بقعة التعالقبين البروتون H-6`b والبروتون `H-5 الموجودة إشارته في الطيف مع مجموعة إشارات بروتونات (H-2` ,H-3` ,H-4`).كل هذه المعطيات الواردة في طيف (COSY(H1, H1 هي تأكيد لصيغة المركب التي وصلنا إليها من خلال الأطياف السابقة.

من كل المعطيات السابقة نصل إلى الصيغة النهائية للمركب CIF_{11}الشكل (38)

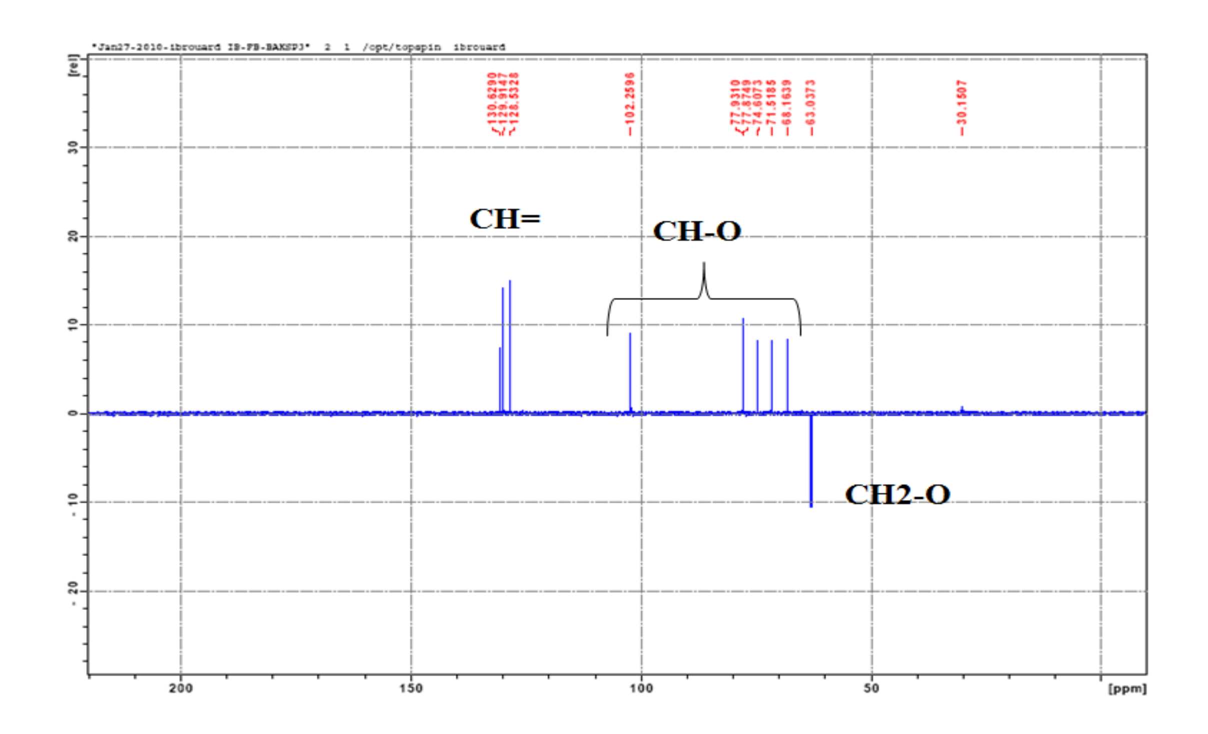
La prunasine (38) الشكل

بالإعتماد على المراجع البيبليوغرافية شكل المركب في الفراغموضح في الشكل (39)

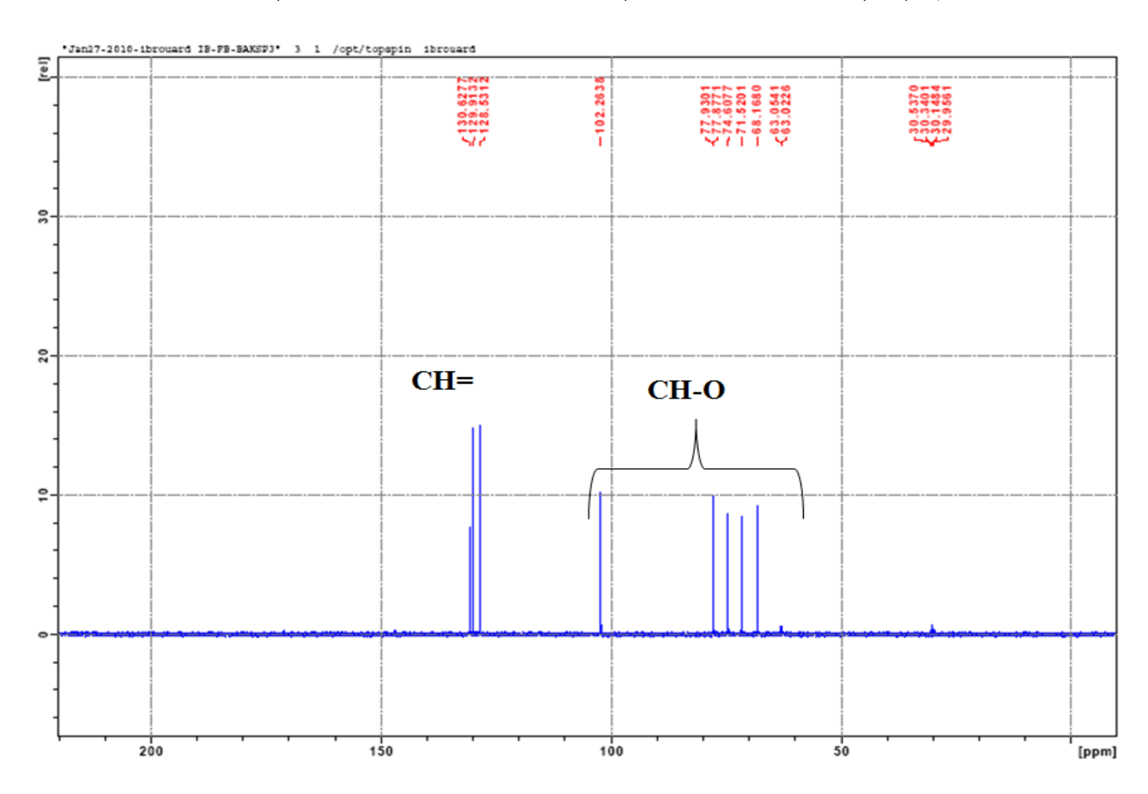
La prunasine   (39) الشكل

- حسب معلوماتنا البيبليوغرافية هذا المركب جديد بالنسبة للنوع *C. involucrata* أما بالنسبة للجنس *Centaurea*سبق وأن فصل في مخبرنا [66] كما تم فصله من

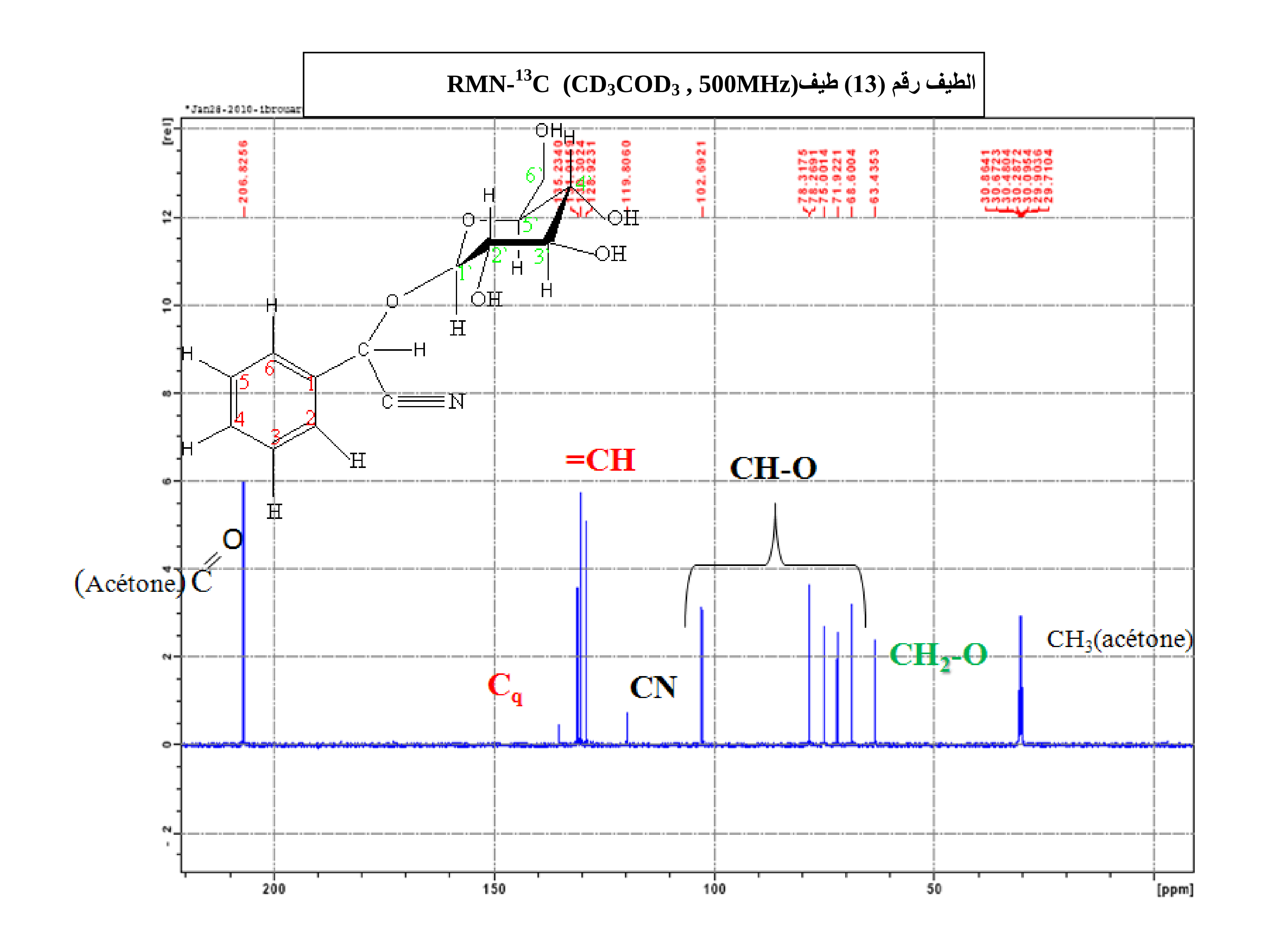
Centaurea asperaVar.Subinermis [67] ,*EucalyptusL'hérit*[68],
Prilla frutescens Var. Acuta[69].



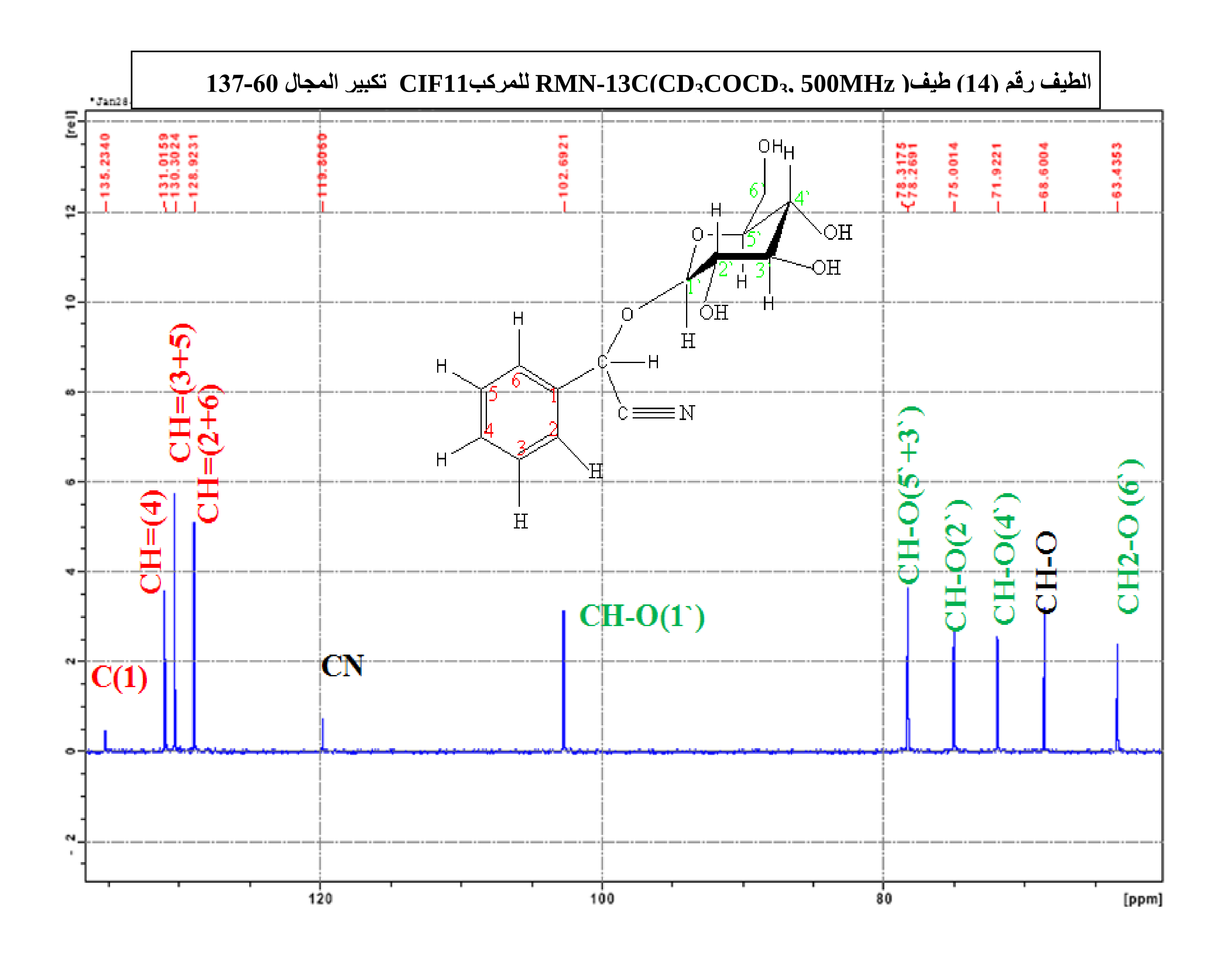
الطيف رقم (11) طيف DEPT 135 $(CD_3COCD_3, 500\ MHz)$للمركب CIF_{11}



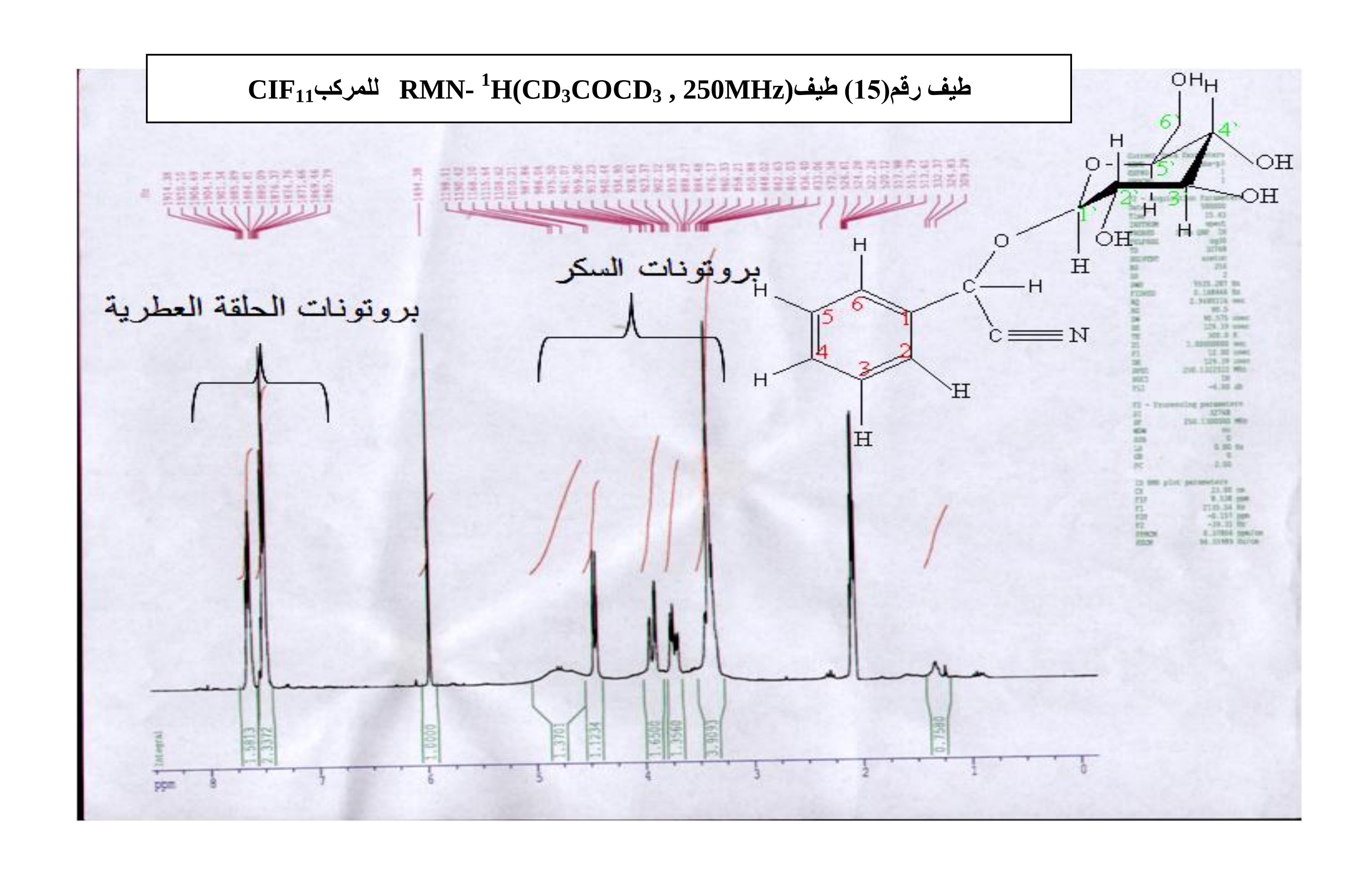
الطيف رقم(12) طيف DEPT90 $(CD_3COCD_3,\ 500MHz)$ للمركب CIF_{11}

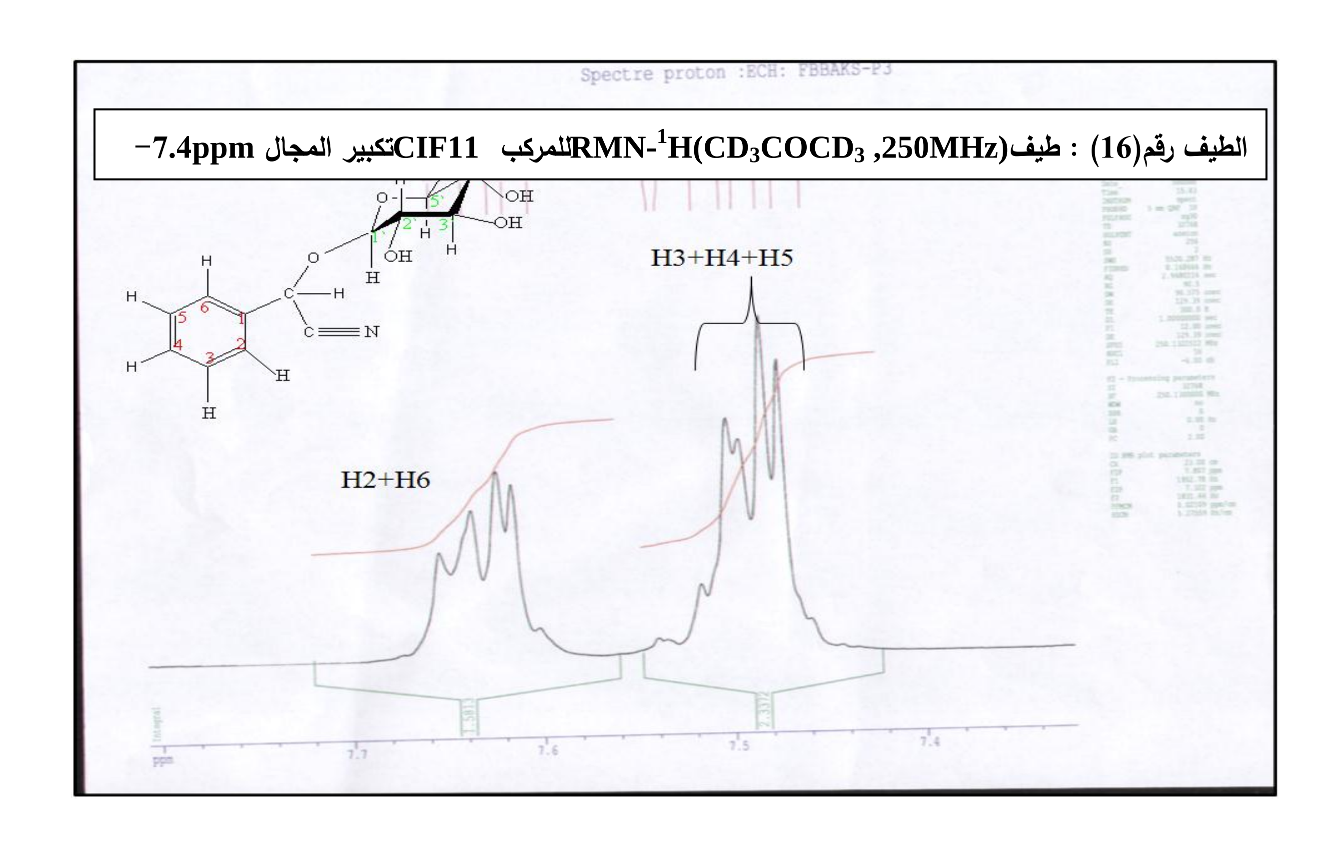


RMN-13C (CD3COD3 , 500MHz)طيف (13) الطيف رقم
=CH
CH-O
Cq
CN
CH2-O
CH3(acétone)
(Acétone) C=O
206.8256
135.2340
130.3024
128.9231
119.8060
102.6921
78.3175
78.2691
75.0014
71.9221
68.6004
63.4353
30.8641
30.6723
30.4804
30.2872
30.0954
29.9036
29.7104
[ppm]
[rel]

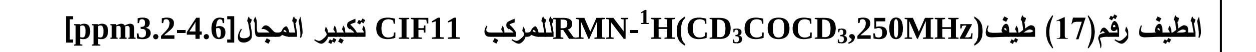


الطيف رقم (14) طيف(RMN-13C(CD_3COCD_3, 500MHz للمركبCIF11 تكبير المجال 137-60

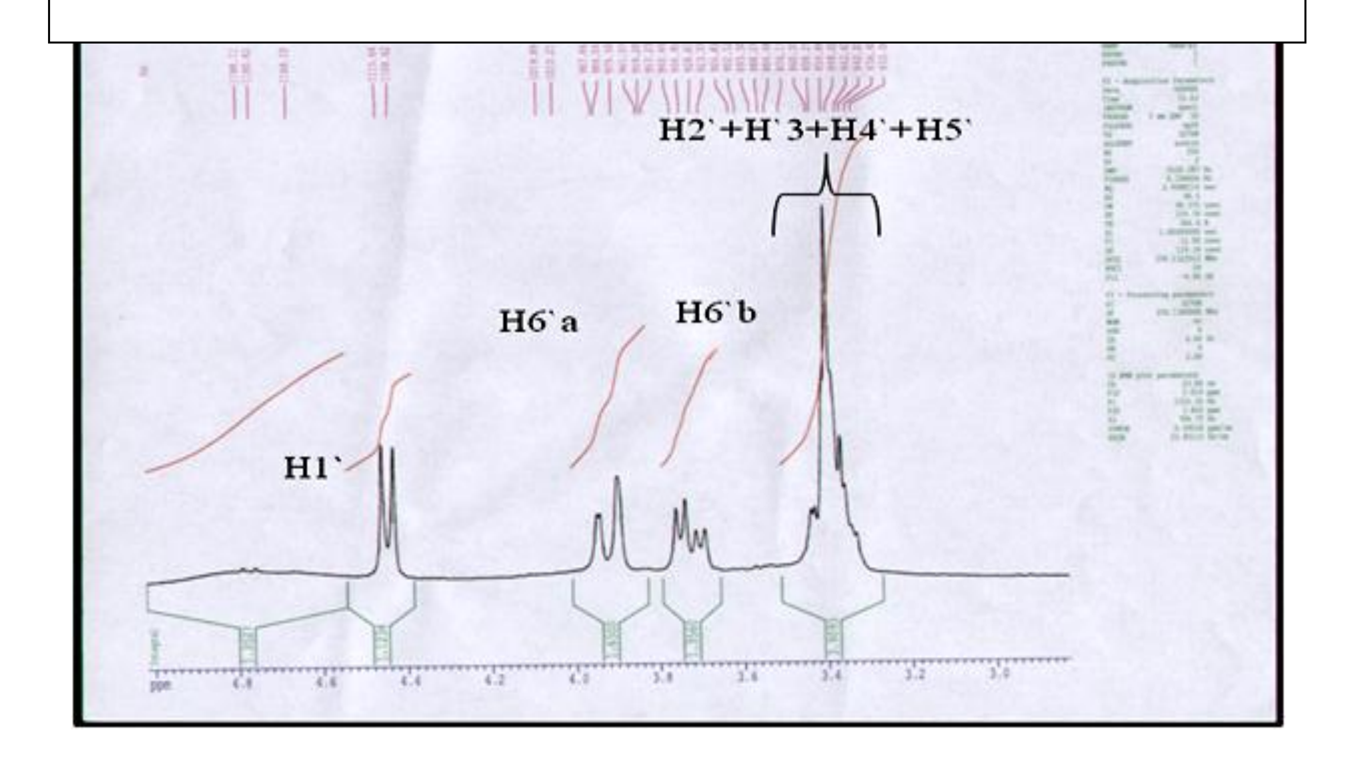

طيف رقم(15) طيف(RMN- 1H(CD3COCD3 , 250MHz للمركب CIF11
بروتونات الحلقة العطرية
بروتونات السكر
1.5813
2.3372
1.0000
1.3701
1.1234
1.6500
1.3560
3.9093
0.7580
ppm



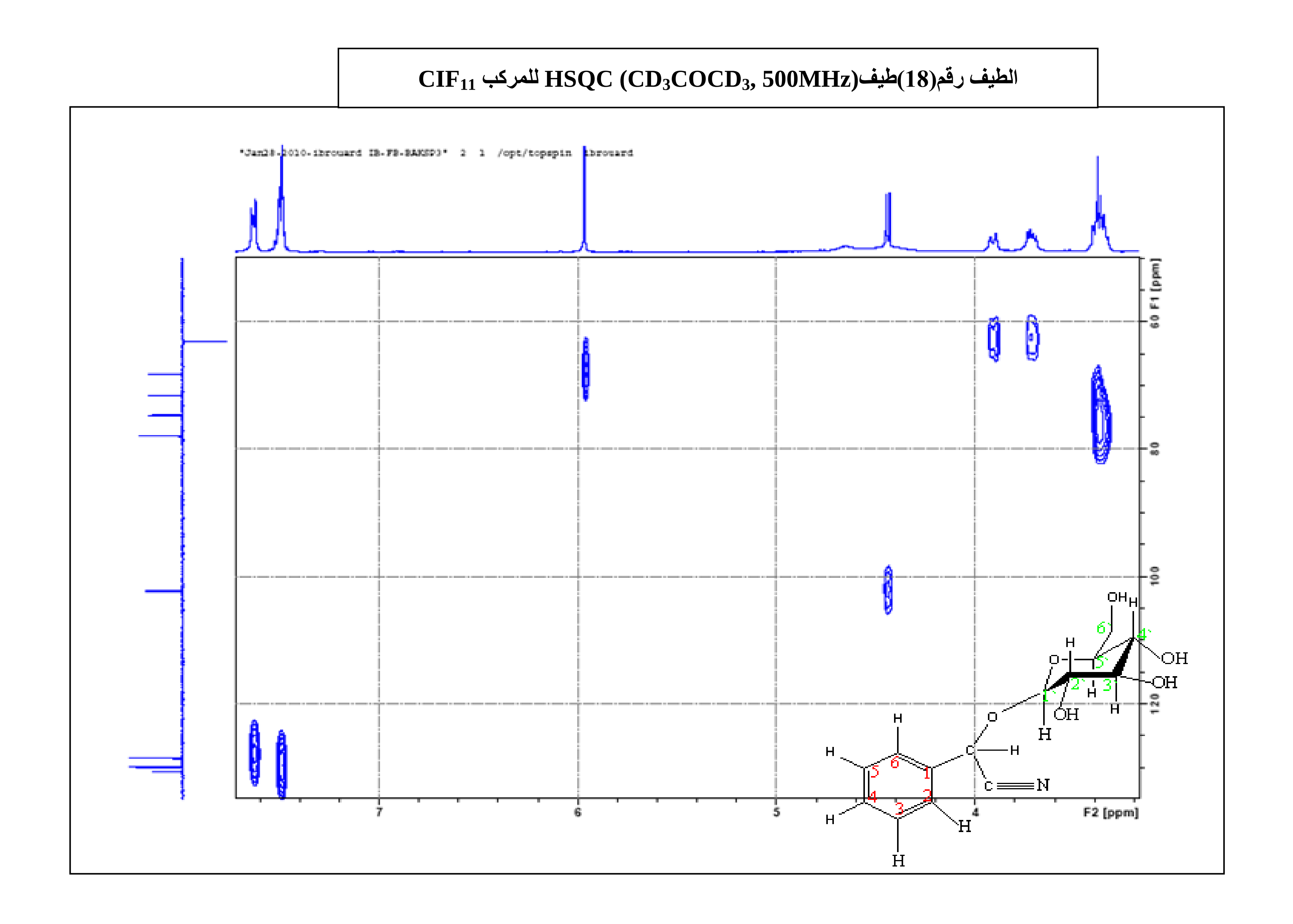
الطيف رقم(16) : طيف$(RMN-^{1}H(CD_3COCD_3$,250MHz للمركب CIF11 تكبير المجال 7.4ppm−



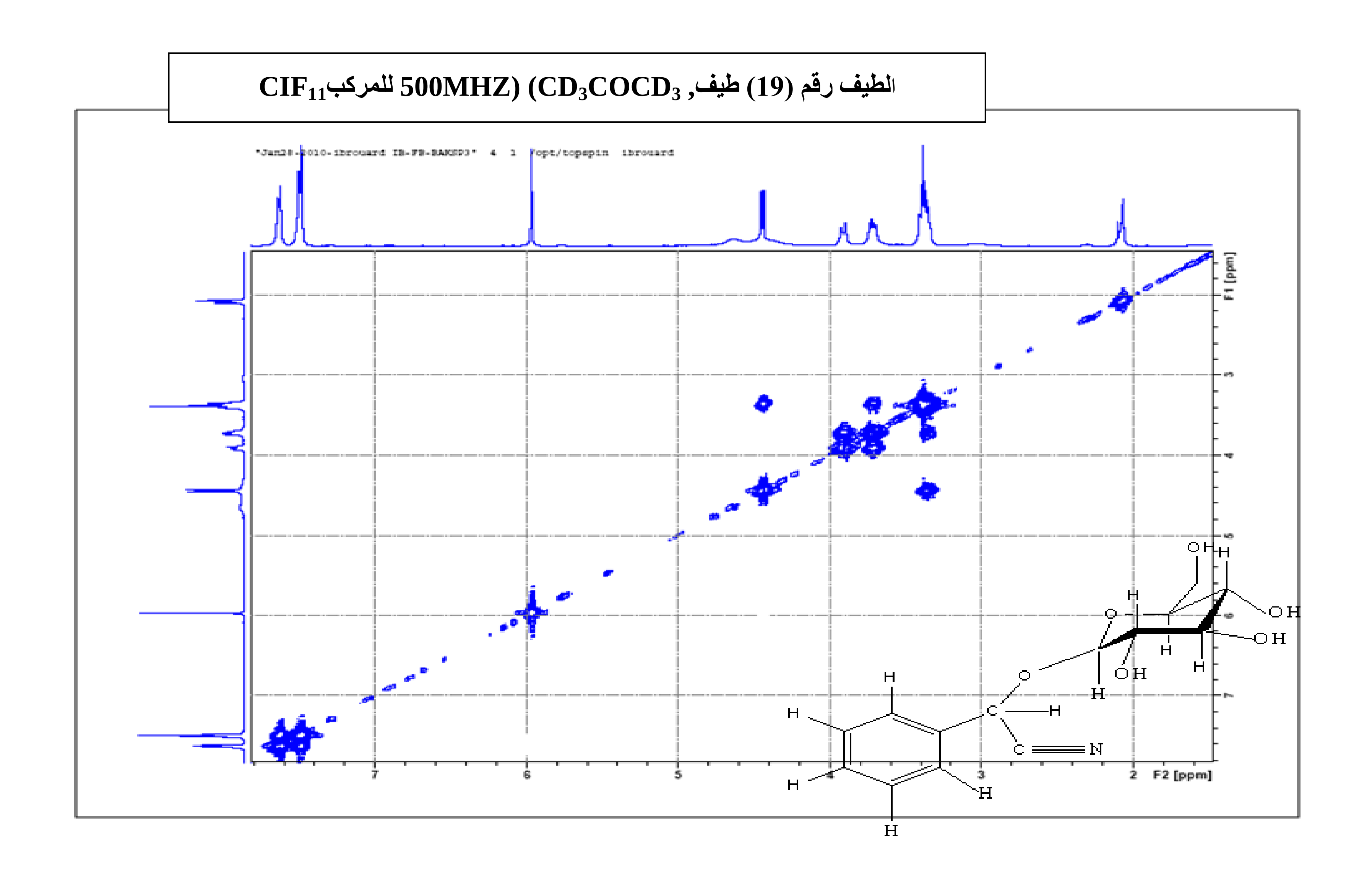
الطيف رقم(17) طيف$(RMN-^{1}H(CD_3COCD_3$,250MHz للمركب CIF11 تكبير المجال[ppm3.2-4.6]



الطيف رقم(18)طيف HSQC (CD_3COCD_3, 500MHz) للمركب CIF_{11}



الطيف رقم (19) طيف ,CD_3COCD_3) (500MHZ) للمركب CIF_{11}



الخاتمة

قمنا بهذا البحث لغاية التعرف على نواتج الأيض الثانوي لنبات ***Centaurea involucrata*** لطورخلات الإيثيل .

في البداية تعرفنا على الفلافونيدات من الجانب النظري أقسام الفلافونيدات طرق الاصطناع الحيوي و المخبري ، طرق الفصل والتنقية وأخيرا الطرق الفيزيوكيميائية المتبعة للتعرف على البنى الكيميائية للمركبات المعزولة .

تمكنا مخبريا من فصل وتحديد الصيغ البنيوية لأربع مركبات هي :

- Acide benzoïque.
- 5,6 ,4` -trihydroxy 6,3`-dimethoxy flavone
- 5,7,4`-trihydroxy 6,3`dimethoxyflavone (Jaceosidine).
- La prunasine .

اعتمدنا في فصل هذه المركبات على الكروماتوغرافيا بأنواعها (كروماتوغرافيا العمود،كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة).

أما تحديد الصيغة البنيوية للمركبات المفصولة تم بالاعتماد على التحليل الطيفي للرنين النووي المغناطيسي $RMN-^{13}C$, $RMN-^{1}H$,DEPT, HSQC,COSY(^{1}H,^{1}H) و طيف الكتلة ESI بالإضافة إلى مطيافية الأشعة فوق بنفسجية – المرئية (UV-VIS).

الملخص

الهدف الرئيسي من هذا البحث هو فصل وتحديد منتجات الأيض الثانوي الفلافونيدي لطورأسيتات الإيثيل لنبتة***Centaurea involucrata*** التي تنتمي إلى العائلة المركبة.

باستعمال طرق الفصل الكروماتوغرافي المختلفة (كروماتوغرافيا العمودCC، كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقةCCM)سمحت بفصل أربع مركبات.

المركبات المفصولة هي :

- Acide benzoïque.
- 5,6 ,4` -trihydroxy 6,3`-dimethoxy flavone .
- 5,7,4`-trihydroxy 6,3`-dimethoxyflavone (Jaceosidine).
- La prunasine

التعرف على البنىالكيميائية للمركبات المفصولة تحققت باستعمال اللإماهة الحمضية، الطرق الطيفية

مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (UV) ، طيف الرنين النووي المغناطيسي(RMN-^{1}H,RMN-^{13}C DEPT, HSQC,COSY(^{1}H,^{1}H)) بالإضافة إلى طيف تحليل الكتلةESI.

هذه المركبات جديدة بالنسبة للنوع***C.inolucrata***أمابالنسبة للجنس***Centaurea***

فصل المركب(Jaceosidine)من*Centaurea nicaensis.All*[21],[66]*Centaurea maroccana*.

أما المركب(prunasine)سبق وأن فصل في مخبرنا [67] كما تم فصله من
Centaurea aspera var.subinermis[68], *Eucalyptus L'hérit*[69], *Prilla frutescens var.acuta*[70].

résumé

L’objectif principal de ce travail est d’identifier des métabolites secondaires (flavonoïdes) contenus dans la phase acétate d’éthyle de l’extrait hydrométhanolique de la plante ***Centaurea involucrata*** qui appartient à la famille des composées.

L'utilisation de différentes méthodes de séparations chromatographiques (colonne, couche mince) a permis d’isoler quatre composés.

Les composés séparés sont :

- Acide benzoïque.
- 5,6 ,4` -trihydroxy 6,3`-dimethoxy flavone .
- 5,7,4`-trihydroxy 6,3`dimethoxyflavone (Jaceosidine).
- La prunasine (un composé cyanogénique).

L’établissement des structures de ces composés a été réalisé grâce à l'hydrolyse acide, les méthodes spectroscopiques (UV, RMN-^{1}H, RMN-^{13}C, DEPT, HSQC, COSY) et de l’analyse des spectres de masse en mode ESI.

Ces composés sont isolés pour la première fois de l’espèce ***involucrata***et pour le genre ***Centaurea*** le composé Jaceosidinea été isolé de*Centaurea nicaensis*.*All* [66] *Centaurea maroccana*[21].

Le composé prunasine a été isolé dans notre laboratoire[67] et de *Centaurea aspera var.subinermis*[68] ,d’*eucalyptus L’hérit*[69] et de*Prilla frutescens var. acuta*[70].

Abstract

The principal aim of the present work consisted to identify the secondary metabolites (flavonoids)present in the acetate ethyl soluble part of the aqueous-methanol extract***Centaurea involucrat***belonged to the compositae family.

The use of the different chromatographic methods (column,thin layer) permitted the isolation of four compounds .

The isolated compounds are:

- Benzoicacid
- 5,6,4`-trihydroxy 6,3`-dimethoxy flavone.
- 5,7,4`-trihydroxy 6,3`dimethoxyflavone .(Jaceosidin)
- prunasin (cyanogenic compound)

The structures of these compounds were established the use acid hydrolysis, the spectroscopic data(UV, RMN-1H, RMN-13C, DEPT, HSQC, COSY) and the ESIMS spectrum.

These compounds are isolated for the first time from the species ***involucrata***. For the genus ***Centaurea***, Jaceosidin compound was isolated from*Centaurea nicaensis.All*.[66] *Centaurea maroccana*[21].

Prunasin compound was isolated in our laboratory[67]. It was also isolatedfrom *Centaurea aspera var.Subinermis*[68] *, Eucalyptus L'hérit*[69] and*Prilla frutescens Var. acuta*[70] .

BIBLIOGRAPHIE
المـراجـع

[1] J. Menz, R. K. winkejmann, Contact Dermatites, 16, 169 (1987).

[2]P. Quezel, S. Santa, Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales,Vol II, p.949, CNRS. Paris (1963).

[3]G.flamini,C.Bullerie,I.MorelliandA.Manunta,J.Nat.prod,63, 662-663 (2000).

[4] Z. F. Ahmed, H. rimpler, F. M. Hamouda, A. M. Rick and S. I.Ismail,plantaMed, 19.

3, 264-269 (1971).

[5] N. Mezache, thèse de magister, Constantine (2002).

[6] K.Medjroubi,F.Benayache,S.Benayache,S.Akkal,N. Khalfallah and P.Aclinou, Guaianolides from *Centaurea musimomum*, Phytochemestry, 45 (7), 1449 (1997).

[7] J.G.platas,C.Ruiz-perez,A.G.Gonzalez,J.BermejoandK.Medjroubi,4β,15-dihydro-3dehydrosolstitialin A, Acta Cryst, 55, 1837 (1999).

[8] S.Akkal,F.Benayache, A. Bentamene, K. Medjroubi, E. Seguin and F. Tellequin, Flavonoid Aglycone from *Centaurea napifolia*,Chemistry of natural compound, 39 (2),219-220 (2003).

[9] S. Akkal, F. Benayache, S. Benayache and M. Jay, Flavonoidsfrom *Centaurea incana*, Biochemical systematic and Ecology, 4, 361 (1997).

[10] R. Bencherait,Thèse de magister,Constantine (1989).

[11] K.Medjroubi,thèse de magister, Constantine (1991).

[12] F. Benayache, S. Benayache, K. Medjroubi, G. Massiot, P. Aclinou, B. drodz and G. Nowak, phytochemestry, 31 (12), 4359-4360 (1992).

[13] G.Athmani,S.Benayache,F. Benayache,H.Dendoughi,M.Jay,J. Alg. Chem, 8 (1),29-36 (1998).

[14] K.Medjroubi,N.Boudardara, F. Benayache, S.Akkal, E. seguinand F.Tellequin, sesquiterpene lactone of *centaurea nicaensis*,Chemistry of natural compound, 39 (5), 506 (2003).

[15] S. Akkal, F. Benayache, S.Benayache, K. Medjroubi, M. jay, F.Tellequin and E. Sguin, New flavone glycoside from*Centaureafurfuracea*, Fitoterapia, 70,368-370 (1999).

[16] S. Delouche, thèse de magister, Constantine (2003).

[17] C. Boubekri, thèse de magister, Constantine (2003).

[18] R. Benakcha,thèse de magister, Constantine (2001).

[19] K. Medjroubi, F. Benayache, S. Benayache, S. Akkal, M.Kaabeche, E. Seguin and F. Tellequin, Eudesmanolide from*Centaurea granata*, phytochemestry, 49 (8),2425 (1998).

[20] A. Bentamene, S. Benayache, J. Creche, J. Bermejo, F. Benayache, sesquiterpene lactones and phenolic compounds from *Centaurea maroccana*, chemistry of natural compounds, 43(6) 749 March-April(2007).

[21]S. Bicha, A. Bentamene, O. Benaissa, S. Benayache, J. Bermejo, V. P. Garcia, F. Benayache, chemistry of natural compounds acceptée.

[22] A. Bentamen, thèse de magister, Constantine (1997).

[23]A. Bentamene, S. Benayache, J. crèche, G. petit, J. Bermejo-Barrera, F. Leon, F. Benayache, a new guaianolide and other sesquiterpene lactones from *Centaurea acaulisL. (Asteraceae).*

[24]A. Bentamene, M. Baz, R. Boucheham, S. Benayache, J. Crèche, F. Benayache, flavonoid aglyconesfrom centaurea sphaerocephala L. chemistry of natural compounds 44(3) 234 March-April(2008).

[25] A. Bentamene, R. Bouchham, M. Baz, S. Benayache, j. Crèche, F. Benayache,

Chemistry of natural coumpounds 46(3) (2010).

[26] T. J. Mabry, M. B. Thomas, K. R. Markham, The systhematic identification of flavonoids,Springer-Verlag, Berlin (1970).

[27] S. Lieberman, N. Bruning, The real Vitamin andMineral, Aver(1997).

[28] J.Bruneton, Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales, p.1120,3ème édition Tec&Doc Lavoisier, Paris(1999).

[29] J. B. Harborne, Flavonoids in phytochemistry, eds, J. B. Litton educational publishing inc, London (1979).

[30] E.Wollenweber, V. H. Dietz, Biochem, syst, ecol, 8, 21 (1980).

[31] J. Bruneton, Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales,EdTec etDoc (1997).

[32] Y. Dacosta, Les phytonutriments bioactifs, Ed Y. Dacosta,669 référencesbibliographiques, Paris (2003).

[33] Docencia.udea.edu.co/~farmacogfit/Flavonoides/D_main.html - 3k.

[34]M. G. Hertog,E. J. Feskens,P. C. Chollman,M.B. Katan, D. Kromhout, Dietaryantioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease the Zutphen Elderly Study , Lancet 342,1007-1011(1993).

[35]P.S. Chaudhry,J. Cabrera, H.R. Juliani , S.D. Varma ,(1983).Inhibition of human lens aldose reductase by flavonoids, sulindac and indomethacin , Biochem Pharmacol.32(1995).

[36]J. F. Christopher, G. H. Neil-Thowers, Phytochemestry,31(9), 3017-3020(1992).

[37] B. Havsteen, Flavonoids class of natural product of highpharmacological potency, Biochemical Pharmacology, 32, 7,1141, 8(1983).

[38]M. Paris, M. Hurabielle, Abregé de matiére médicale, Pharmacognosie. Vol I. Paris - New York – Barcelone, Masson (1981).

[39] C. Kandaswarmi, E. Perkins, D.S. Drezewiecki, E. Middleton, Anti –cancer drug,

Differential inhibition of proliferationof human squamous cell carcinomz and embryonic fibroblastlike lung cells in culture by plant flavonoids, 3, 525-530(1992).

[40] R. Robinson, Nature 137, 1172 (1936).

[41] G. Richter, Metabolism des Végéteaux,physiologie et biologie, eds, press polytechniqueet universitaire romandes, Lausanne (1993).

[42] H. Dendougui, Thèse de magister , Constantine(1989).

[43] M. J. Turner, B. W. Smith, E. J. Haslam, Chem, Soc, perkin, 52, 5 (1975).

[44] V. Deluca, R. K. Ibrahim, Arch, Biochem, Biophs, 606 (1985).

[45] P. R. Gayon, Les composés phénoliques desvégétaux, edsDunod, Paris (1968).

[46] J. B. Harborne, Biochemistry of phenolics compounds ,Academic press, New - York (1964).

[47] J. Chopin, Actualités de phytochimie fondamentale, 2eme Série,édsMasson, Paris, 119 (1966).

[48] L. Jurd, The chemistry of flavonoids compounds, Pergamon press,New – York (1962).

[49] J. B. Harborne, The flavonoids advances in research since 1980,edsChapman and Hall, New -York (1989).

[50]J. B. Harborne, The flavonoids, Academic press,London(1980).

[51] K. R. Markham, Technique of flavonoid identification, Academicpress, London (1982).

[52] H. K. Wang , S. Y. Lin, K. M. H. Wang ,G. Tylor and M. Lee, Bioorg, Med,chem, 2, 1397(1994).

[53] Randerathk,Chromatographie sur couches mince ,edsGautierVillard(1971).

[54] J. B. Harbone,The flavonoids,V.1,eds Champan andHall,London(1975).

[55]J.B. Harborne, T. Swain, Prespectives in phytochemistry.Academic press, London (1969).

[56] E. Wollenweber, In the flavonoids-Advances in Research (J.B.Harborne and J. J. Mabry, eds, Chapman and Hall, London, New -York) (1982).

[57] M. A. Lacaille-Dubois, H. Wagner, 20ème Aniversaire du groupepolyphenols(book of abstacts) vol I(16), 217, 13-16 (1992).

[58] K. R. Markham, H. Geiger, In The Flavonoids, edited by J.B. Harborne (1993). Chapman and Hall, London (1994).

[59] M. Becchi, D. Fraisse, Fast atom bombardment and Collision Activated-dissociation mass-analysis ion Kin tics analysis of C-Glycosidic flavonoids.Biomedical and enveronmental masselectrometry, 18,122-130(1989).

[60] J. F. Gonnet, A propos de la photographie en couleur dechromatographie sur couches minces en lumière de Wood, J, of chromato, 86, 192 (1973).

[61] M. J. Boland, E.Wong, J. Aur, Biochem, 50,383,(1975).Biorg,Chem,8,1 (1979).

[62] G.Kochs, H. Grisebach, J. Aur, Biochem, 155-311(1986).

[63] http://www.tela-botanica.org/eflore/BDAFN/1.00/nn/136725(2005).

[64] G. Atmani, thése de magister, Constantine .

[65] P. K. Agrawal**,** Phytochemistry, 31(10), 3307-3330 India (1992).

[66] L. Hammoud, thése de magister,Constantine(2009).

[67] L. Cardona, I. Fernandez, J. R. Pedro and R. Vidal, polyoxygenated terpenes and cyanogenic glucosides from *Centaurea aspera Var .Subinermis*, phytochemistry,31(10), 3507-3509 (1992).

[68] R. M. Gleadow, I. E. Dun habwyak, M. E. Conn, H. Conn eric, frequency and distribution of cyanogenic glycosides in *Ecalyptus L'hérit*, phytochemistry,69,1870-1874(2008).

[69] M. Aritomi, T. Kumori and T. Kawasaki, cyanogenic glucosides in leaves of *Perilla frutescens Var.Acuta*,phytochemistry,24(10), 2438-2439(1985).